

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université ABDERRAHMANE MIRA (Bejaia)

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire de master

Discipline : Sciences de la Nature et de la Vie

Option : Biochimie appliquée

Thème

Etude comparative des profils protéiques sanguins et urinaires des patients atteints de tumeurs cérébrales

Présenté par :

M^{elle} Bensidhoum Besma

M^{elle} Bensoula Zohra

Devant le jury :

Présidente : M^{me} Marzouk H

Encadreur : M^r Ghidouche A

Examineur : M^r Harfi T

Examinatrice : M^{me} Saadaoui

Année : 2013-2014



Remerciements

A dieu, le tout puissant de nous avoir donné la force et la santé de mener à bien ce travail jusqu'au bout de ce cycle.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans les forces conjuguées de plusieurs personnes en particulier :

Mlle Khetta B de nous avoir accepté dans son laboratoire en mettant le matériel nécessaire à notre disposition.

L'équipe de laboratoire de biophysique qui nous a donné la chance d'effectuer la technique d'électrophorèse.

La technicienne de laboratoire de chimie industrielle qui nous a permis d'utiliser la spectroscopie IR-TF.

Le service neurochirurgie du CHU Khalil Amran qui nous a offert leurs échantillons nécessaires à la réalisation de ce mémoire.

A Dr Ghiddouche A pour sa prise en charge, sa patience et son savoir dont il nous a gratifiés tout au long de ce travail.

Une place particulière à Mlle Ait Ali pour son aide, ses conseils et ses encouragements précieux.

Nos chaleureux remerciements aux membres de jury

Grand merci à nos parents et à nos amis



Dédicaces

A mes chers parents :

Abdelmalek : le soutien morale et l'esprit de sacrifice m'ont toujours marqué au cœur *Abi*, que dieu t'accorde une longue vie et te préserve à nos côtés.

Farida : tes souffrances, ta patience et ta tendresse affectueuses m'ont toujours encouragé vers le mieux, qu'Allah te fasse bénéficier le fruit de ta patience.

A mes chers sœurs Sarah et Meriem.

A ma sœur fi Allah Soumia.

A mon adorable grand-mère Ounissa.

A la chère cousine Céline, le témoin de l'année.

A tous mes amis : Samira, Kahina, Halim, Khaled, Adlen, Farida, Ahlem Lamia, Sihem, Wassila, Faouzi, Lydia, Habiba, Zaki, Sofien, Oussama et les autres.

A toute la promotion Biochimie appliquée

A toute la section de 1^{ère} année de Saad Dahleb -Blida

A tous les malades ayant connu les souffrances de la tumeur

A mon promoteur Dr Ghiddouche A.

Bensoula Z



Dédicace :

Je dédie ce modeste travail à :

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes adorables grand-mères : Hada et Mnana que dieu leur accorde une longue vie

A mes très chères sœurs : Rose, Lynda et son mari Ramzy, Biba, Wissem et mon cher et unique frère Anis qui m'ont énormément aidée et à qui je témoigne mon affection et ma profonde reconnaissance

A mon cher oncle Rachid qui m'a toujours aidé et encouragé et sa famille

A mes très chère nada et marie que je ne s'aurais jamais remercié

A mes très chères tantes et chers oncles

A mes adorables cousines et cousins

A mon binôme Zohra et toute la famille Bensoula

A tous mes amis : Samia, Farida, Kahina, Samira, Zahra, Nabila, Hana, Dédine, Adlen, Khaled, Halim, Rafik, Laarbi....

A toute la promotion Biochimie appliquée

A mon promoteur Dr Ghiddouche A.



Besma

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Problématique 1

Introduction

Chapitre I :

I- Le système nerveux.....	2
I-1- Organisation structurale du cerveau	2
I-1-1- Le Télencéphale.....	3
I-1-2-Le diencephale.....	4
I-2-Organisation tissulaire du cerveau	5
I-2-1-Les neurones.....	5
I-2-2-les gliocytes	5
I-3-La barrière hémato-encéphalique.....	7

Chapitre II :

II-Généralité sur le cancer.....	8
II-1-Définition.....	8
II-2-la cancérogenèse.....	9
II-3- Propriétés des cellules cancéreuses	10
II-4-Tumeurs cérébrales.....	12
II-4-1- Définition	12
II-4-2-Symptômes.....	12
II-4-3. Classifications.....	13
II-4-3-1- Classifications selon l'origine tissulaire	13
II-4-3-2- Classifications selon l'organisation mondiale de la santé (OMS)	13
II-5-Les marqueurs tumoraux	14
II-5-1- Définition	14
II-5-2- Caractéristiques d'un marqueur tumoral.....	14

II-5-3- L'intérêt des marqueurs tumoraux	14
II-5-4-Classification.....	16
II-5-4-1- les marqueurs de fonctions	16
II-5-4-2-les marqueurs de l'immunité.....	16
II-5-5- Les marqueurs de tumeurs cérébrales	17
Chapitre III :	
III- Les liquides biologiques	18
III-1-le sang.....	18
III-2-les urines.....	19
III-3-La filtration du sang et la formation des urines.....	20
III-3-1-Le rein	20
III-3-2-Les fonctions du rein.....	20
III-3-3-La formation des urines	20

Matériels et méthodes

Les méthodes d'analyse protéique

I- Les méthodes colorimétriques.....	21
I-1-La méthode de Bradford	21
II-Les méthodes non colorimétriques	24
II-1- L'électrophorèse	24
II-2-La spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (IF-TR)	28

Partie pratique et discussion

III- Préparation des échantillons et des solutions	36
III-1-Préparation des solutions	36
III-2-Préparation des échantillons.....	36
VI- La méthode de Bradford.....	38
VI-1-La courbe d'étalonnage.....	38
VI-2-Le dosage des protéines dans les échantillons du sang et des urines.....	40
V- La méthode de l'électrophorèse.....	44
V-1-Préparation des échantillons.....	44
V-2-Préparation des gels, tampon de migration et la solution de coloration et de décoloration	45
V-3-La réalisation de l'électrophorèse	48

Conclusion

Bibliographie

Glossaire

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : La structure du système nerveux central.....	2
Figure 2 : Les différents lobes de télencéphale	3
Figure 3 : Structure interne de diencéphale	4
Figure 4 : Représentation schématique d'un neurone	5
Figure 5 : Les cellules gliales du système nerveux central	6
Figure 6 : La théorie de Knudson dans le développement des tumeurs	8
Figure 7 : Les caractéristiques des cellules tumorales.....	10
Figure 8 : Composition du sang.....	18
Figure 9 : Les principales protéines sériques	19
Figure 10 : La structure d'une molécule du bleu de coomassie	27
Figure 11 : Sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel électrophorèses	29
Figure 12 : Formule développée de l'acrylamide et de bis-acrylamide	30
Figure 13 : La mise en place de l'électrophorèse	31
Figure 14 : Principe de la spectroscopie IR-TF.....	33
Figure 15 : Le devenir des radiations IR émises	34
Figure 16 : Conversion d'interférogramme en spectre.....	34
Figure 17 : Le réactif de Bradford préparé.....	36
Figure 18 : Les échantillons du sang utilisés.....	37
Figure 19 : Les échantillons des urines utilisées	38
Figure 20 : Résultats de la courbe d'étalonnage.....	39
Figure 21 : Les échantillons préparés pour l'électrophorèse.....	44
Figure 22 : La mise en place l'électrophorèse.....	48
Figure 23 : Le profil électrophorétique des différents échantillons du sang et des urines	48
Figure 24 : La cellule à circulation.....	51
Figure 25 : Le profil de tous les échantillons des urines	52
Figure 26 : Les profils de tous les échantillons du sang.....	53

Liste des tableaux

Tableau 1 : Utilisation clinique de quelques marqueurs tumoraux dans certains types de tumeurs	15
Tableau 2 : Les plus courantes méthodes colorimétriques	28
Tableau 3 : Gamme de séparation des molécules en fonction de la concentration en acrylamide	30
Tableau 4 : Les différents types d'électrophorèse	32
Tableau 5: Age et sexe de chaque patient atteint de tumeurs cérébrales	37
Tableau 6 : Les absorbance de la gamme étalon mesurées à 596 nm Absorbance du blanc : 0,466	38
Tableau 7: L'absorbance et la concentration de chaque échantillon du sang	40
Tableau 8 : L'absorbance et la concentration de chaque échantillon d'urines.....	40
Tableau 9 : Tableau récapitulatif de l'âge, sexe et les concentrations protéiques de chaque patient	41
Tableau 10 : Le facteur sang/urines calculé pour chaque patient.....	43
Tableau 11 : Composition chimique du gel de séparation	45
Tableau 12: Composition chimique du gel de concentration	46
Tableau 13 : Composition chimique du tampon de migration	46
Tableau 14 : La composition chimique de la solution de coloration	47
Tableau 15 : La composition chimique de la solution de décoloration.....	47
Tableau 16 : Présence ou absence du pic (2400 à 2000 cm^{-1}) dans les profils du sang et d'urines de chaque patient	54

Liste des abréviations

ACE : Antigène carcino-embryonnaire.

AFP: AlphaFoetoProtéine.

APS: Ammonium per Sulfate

BHE: Barrière Hémato Encéphalique.

CA : Antigène de Cancer.

CPS : Concentration Plasmatique Sanguine.

CPU : Concentration Plasmatique Urinaire

EGFR: Récepteur de Facteur de Croissance Epithélial.

EMT : Epithélio-Mésenchymateuse

EPO: Erythropoïétine.

GFAP: Protéine Glio-Fibrillaire Acide.

HCG : Hormone Chorionique Gonadotrope.

HTIC : Hypertension Intracrânienne

INC : Institut National du Cancer

IR-TF : Infrarouge à Transformée de Fourier

ISPED : Institut de Santé Publique d'Epidémiologie et de Développement

LCR: Liquide Céphalo-Rachidien.

MT : Marqueur Tumoral

NSE : Neurone Spécifique Enolase.

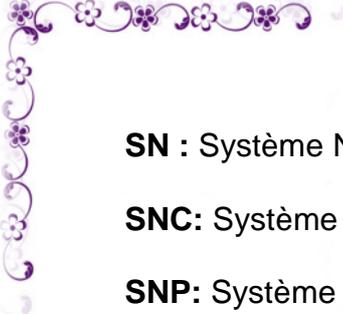
OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

PDGF : Facteur de Croissance Dérivé des Plaquettes

PSA : Antigène Spécifique de la Prostate.

Rb : Rétinoblastome

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate.



SN : Système Nerveux

SNC: Système Nerveux Central.

SNP: Système Nerveux Périphérique.

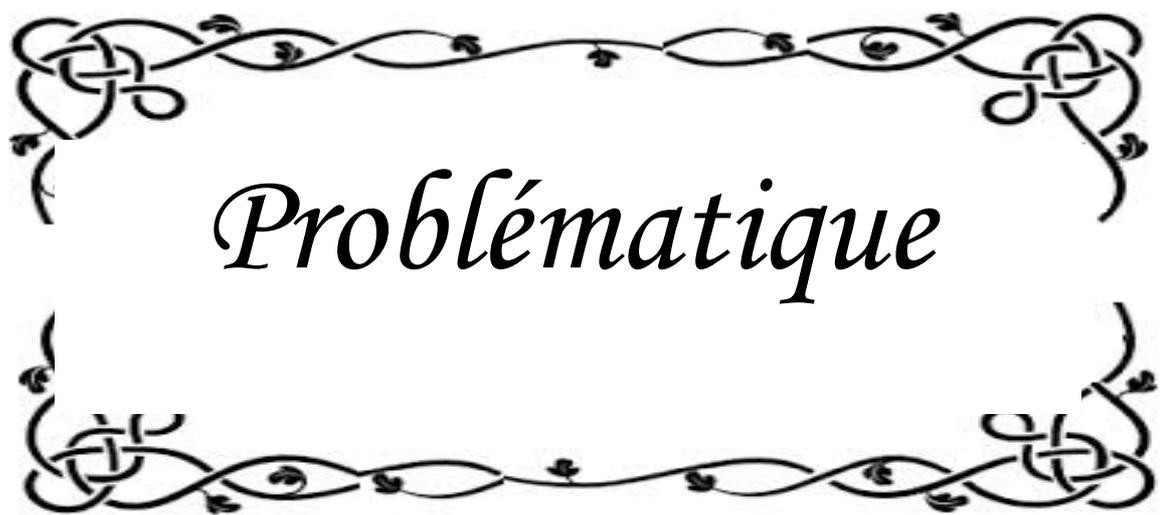
TEMED : Tétra Méthyl Ethylène Diamine.

TGF : Facteur de Croissance de Transformation

TSP1 :Thrombospondin 1

VEGF: Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire





Problématique

Le cancer est une maladie mortelle, caractérisée par une prolifération anormale de cellules dans un tissu ou organe donné, menaçant son bon fonctionnement et sa survie. Tant que le cerveau est l'organe de réponse aux besoins de l'organisme, toute altération qui le touche, peu lui provoqué des effets néfastes notamment la tumeur cérébrale qui engendre une forte mortalité et morbidité des patients.

Tant que les marqueurs tumoraux ont longtemps été des molécules que les premiers utilisateurs voyaient comme un moyen de diagnostic et de pronostic des cancers ; une prise du sang et des urines peut servir à des dosages protéiques pour pouvoir comparer les profils de ces deux fluides biologiques. Les marqueurs tumoraux utilisés pour la détection et le suivie des tumeurs cérébrales restent peu nombreux, posant ainsi la nécessité d'identifier de nouveaux marqueurs. L'intérêt de cette étude est d'explorer de nouvelles pistes pouvant mener à l'identification de profils protéiques pouvant être utilisé comme marqueurs et permette le suivie de l'efficacité thérapeutique du traitement pour faciliter le diagnostic et améliorer leur mode de vie.

A decorative border consisting of two horizontal lines of intricate, symmetrical floral and scrollwork patterns. The patterns are mirrored across the top and bottom lines, framing the central text.

Introduction

I- Le système nerveux

Le système nerveux (SN) est le centre de la régulation et de la communication de l'organisme (*Marieb, 2008*). Il comprend deux grandes divisions : le système nerveux centrale (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP) (*Solomon et Davis, 1981*).

Le SNC est formé de l'encéphale et de la moelle épinière (*Marieb, 2008*).

- L'encéphale : est la partie du SNC incluse dans la boîte crânienne, il est composé du cerveau, cervelet et tronc cérébral (*Marieb, 2008*).
- La moelle épinière : est située dans le canal rachidien. Elle est subdivisée en quatre régions : cervicale, thoracique, lombaire et sacrée (*Richard et Orsal, 2001*).

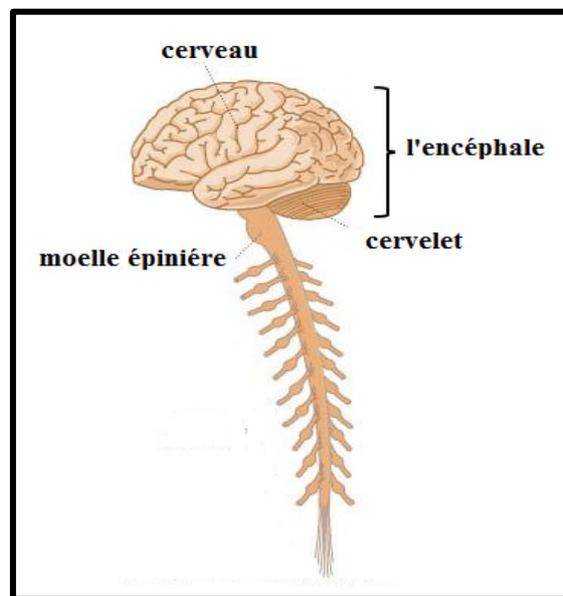


Figure 1 : la structure du système nerveux centrale

Le SNP représente l'ensemble de nerfs crâniens, nerfs spinaux et ganglions (*Vallat et Magy, 2005*).

I-1- Organisation structurale du cerveau :

Le cerveau humain est une masse de tissu plissé et mou d'environ 1,4 kg (*Solomon et Davis, 1981*). Composé d'environ 80% d'eau lui conférant ainsi un aspect gélatineux (*Schnider, 2008*). Sur le plan anatomique le cerveau se divise en deux structures différentes ; le télencéphale et le diencéphale.

I-1-1- Télencéphale :

C'est la plus grosse et la plus remarquable partie du cerveau humain. Elle contient plus de 15 milliards de neurones et 50 milliards de cellules gliales, elle contrôle les activités motrices et interprète les sensations (*Solomon et Davis, 1981*). Une fine couche de substance grise recouvre la totalité de la surface du télencéphale et contient 70% de l'ensemble de neurones du cerveau (*Menche, 2006*), correspond au cortex cérébral,

Les scissures existantes au niveau du cerveau permettent de le divisé soit en hémisphère droit et gauche ou bien en quatre grands lobes : lobe frontal, lobe pariétal, lobe occipital et le lobe temporal :

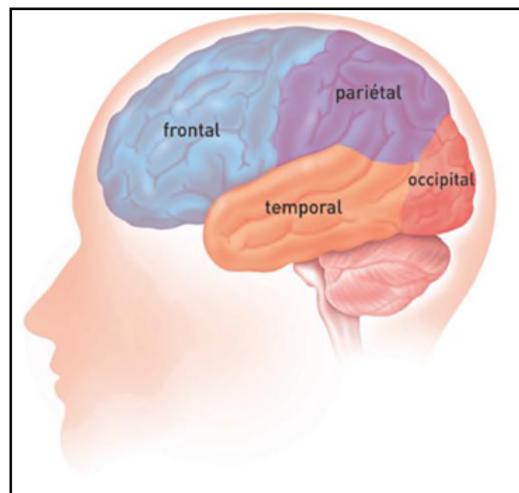


Figure 2 : les différents lobes du télencéphale (*Adapté de l'INC, 2010*)

Chaque hémisphère est partagé en quatre zones appelées lobes, dans lesquels ces différentes fonctions sont gérées : le lobe frontal, le lobe pariétal, le lobe temporal et le lobe occipital

a. Le lobe frontal

Il est situé dans la partie antérieure (avant) des hémisphères cérébraux. Il abrite les centres chargés du contrôle musculaire, de la pensée, de la mémoire, du raisonnement et des associations. Selon certains chercheurs il serait également le siège de la personnalité (*Jürg Hablützel, 2009*)

b. Le lobe pariétal

Il est situé dans la partie moyenne du cerveau. Il reçoit les informations relatives au toucher et à l'orientation spatiale (*Jürg Hablützel, 2009*)

c. Le lobe occipital

Il est situé à l'arrière des hémisphères, près de l'os occipital du crâne. Il abrite les centres responsables de la vision (*Jürg Hablützel, 2009*)

d. Le lobe temporal :

Il est situé sur le côté, près des tempes. Il abrite certains sens tel que l'audition, du goût et de la mémoire (*Jürg Hablützel, 2009*).

I-1-2- le diencephale :

Composé des structures du thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus (**figure 3**) Le diencephale se trouve au centre du cerveau et enfoui dans les structures télencéphaliques. (*Marieb, 2008*).

➤ **Le thalamus :** (du grec : chambre à coucher) :

De forme ovoïde, il est composé principalement de la substance grise. Il agit comme un filtre qui ne peut être franchi que par des influx ayant un intérêt pour l'ensemble de l'organisme (*Menche, 2006*)(*Marieb, 2008*).

➤ **L'hypothalamus :** (du grec : hypo=dessous, thalamos=chambre) est la partie la plus inférieure de diencephale, elle représente une liaison entre le système nerveux et le système hormonal (*Menche, 2006*). Représentant ainsi, le centre de la soif, de l'appétit, de la libido, de la douleur et du plaisir (*Marieb, 2008*).

➤ **L'épithalamus :** désigne la partie dorsale du diencephale, ces principales éléments produisent le liquide cérébraux spinal (*Marieb, 2008*).

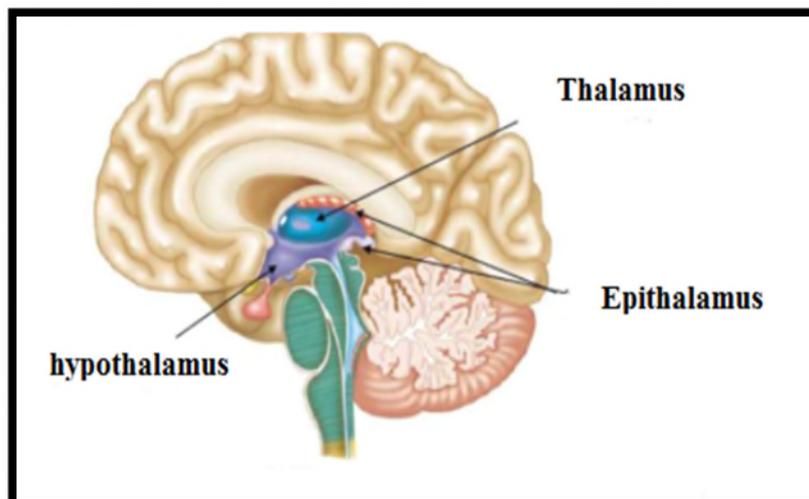


Figure3 : structure interne du diencephale (*Simon,2009*)

I-2- Organisation tissulaire du cerveau :

Les cellules caractéristiques du cerveau sont les neurones et les gliocytes.

I-2-1 -les neurones :

Le neurone est l'unité morphologique et fonctionnelle de tissu nerveux, spécialisé dans la transmission de l'influx nerveux entre les diverses parties du corps. Ils peuvent présenter des variations structurales, mais ont de nombreux points communs : le corps cellulaire, l'axone et les dendrites (*Marieb, 2008*).

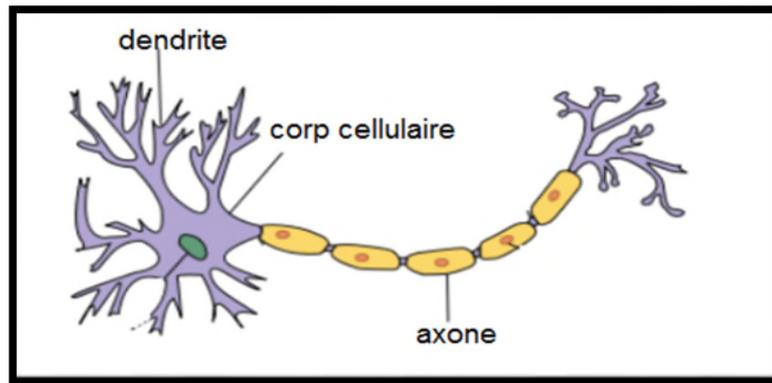


Figure 4 : Représentation schématique d'un neurone (*Marieb, 1999*).

L'unité sécrétrice est le corps cellulaire qui porte des prolongements courts, les dendrites, représentant l'unité réceptrice, et un prolongement axonal correspondant à l'unité conductrice.

I-2-2 -Les gliocytes :(du grec glia : la colle)

Ensemble de cellules servant à la protection, l'isolement et le soutien des neurones (*Marieb, 2008*). Représentent 90% des cellules du cerveau chez l'homme (*Richard et Orsal, 2001*). On distingue quatre principaux types de cellules gliales dont chacune remplit des fonctions particulières :

• Les astrocytes :

Ce sont les cellules les plus abondants des gliocytes, ont une forme d'étoile, ramifié au tour d'un corps cellulaire. Ils se trouvent dans le cerveau et dans la moelle épinière (*Menche, 2006*).

Ils participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique (*Rouleau, 2009*), et permettent le maintien de l'homéostasie du milieu extracellulaire en transportant des ions et des neurotransmetteurs en excès à l'intérieur de leur cytoplasme (*Nadrigny, 2006*).

- **Les oligodendrocytes :**

Plus petites et moins nombreux que les astrocytes, ils sont pourvus de prolongements aplatis et forment les gaines de myéline (*Marieb, 2008*)(*Menche, 2006*).

- **Les microglies :**

Ont une forme d'araignée (*Marieb, 2008*), elles représentent 10% des cellules gliales (*Bouyssiers, 2009*). Ils sont des macrocytes qui éliminent les débris tel que les cellules morte de l'encéphale (*Marieb, 2008*).

- **Les épendymocytes :**

Ce sont les cellules ciliées de type épithélial tapissant les cavités de l'encéphale et de la moelle épinière. Le battement de leurs cils facilite la circulation du liquide cérébrospinal (LSC) (*Marieb, 2008*).

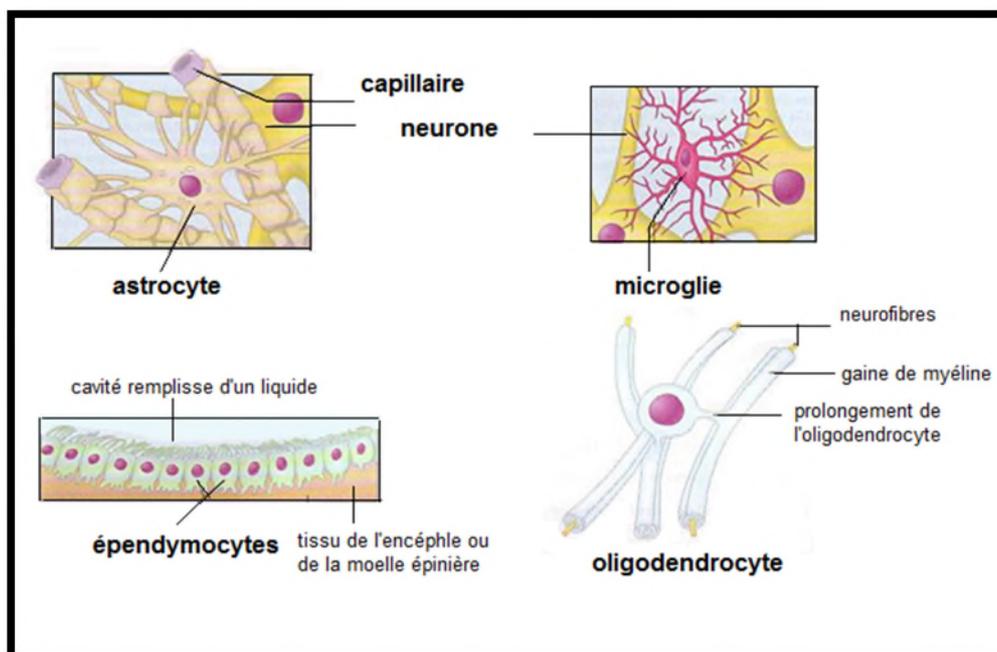


Figure 5 : les cellules gliales du système nerveux central (*Marieb, 2008*)

La glie centrale correspond aux : astrocytes qui émettent des prolongements en se liant aux capillaires et aux neurones, les oligodendrocytes en myélinisant les neurones, les épendymocytes en recouvrant les cavités ventriculaires et les microglies en protégeant les neurones

I-3-La barrière hématoencéphalique (BHE) :

Contrairement aux autres tissus de l'organisme, le tissu nerveux de l'encéphale a besoin d'un milieu interne constant pour bien fonctionner. La maintenance de l'homéostasie de ce milieu est réalisée grâce à un système biologique complexe, la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette barrière est une structure qui sépare le sang du parenchyme cérébral. Elle est absente au niveau de l'hypothalamus et les plexus choroïdes et incomplète chez les nouveau-nés (*Marieb, 2008*).

Les cellules endothéliales constituant la première couche de la BHE n'ont pas les mêmes propriétés que dans le reste de l'organisme : elles n'ont pas de fenestrations, sont unies les unes aux autres par des jonctions serrées étanches (*Bailey et al., 2006*).

La BHE sert à protéger le fonctionnement du cerveau, de la moelle épinière et des racines nerveuses intradurales (*Lo, 2001*). Le passage des solutés du sang vers le parenchyme nerveux n'est pas absent mais est contrôlé : les substances de petite taille liposolubles passent facilement la barrière ; les nutriments tels que le glucose utilisent des transporteurs spécifiques et d'autres substances comme l'insuline sont soumises à l'endocytose médiée par des récepteurs (*Ballabhet al., 2004*).

La BHE est susceptible de devenir anormalement perméable dans diverses circonstances : inflammation, irradiation et présence d'une tumeur cérébrale. La conséquence de cette perméabilité anormale est à l'origine de la pénétration de substances habituellement exclues du cerveau (*ISPED, 2006*). Cependant des mesures quantitatives de la perméabilité des capillaires, sur model animal ou sur gliomes humains ont montré que la perméabilité de la BHE dans les gliomes varie et augmente de 10 à 30 fois par rapport au cerveau sain (*Rousseau ; 2007*).

II- Généralité sur le Cancer :

II-1- Définition :

Le cancer est la cause de 14% des décès dans le monde et de 25% dans les pays Industrialisés (*Boyle and Levin, 2008*), caractérisée par une prolifération anormale de cellules dans un tissu normal, cette prolifération est due à une ou plusieurs mutations génétiques successives faisant acquérir la cellule diverses caractéristiques spécifiques dont la perte de l'inhibition de contact et les mécanismes de régulation du cycle cellulaire (*Benzekry, 2011*).

Knudson a proposé en 1971 une hypothèse sur le développement des tumeurs qui rendait compte de la fréquence élevée des formes bilatérales de rétinoblastome, survenant dans les premiers mois de vie dans les cas familiaux, et, de la plus grande fréquence des formes unilatérales avec un diagnostic plus tardif dans les cas sporadiques (*Knudson, 1971*) ; Cette théorie suppose l'apparition de deux mutations successives touchant les deux allèles d'un gène dans une même cellule (*Pedeutour ; 2006*). On distinguera deux cas :

Premier : Une personne qui hérite une copie muté (mutation constitutionnelle) doit subir une seconde mutation (somatique) pour développer un rétinoblastome

Deuxième: Deux mutations somatiques peuvent également être à l'origine d'un rétinoblastome chez une personne non prédisposée (*Delahaye , 2008*)

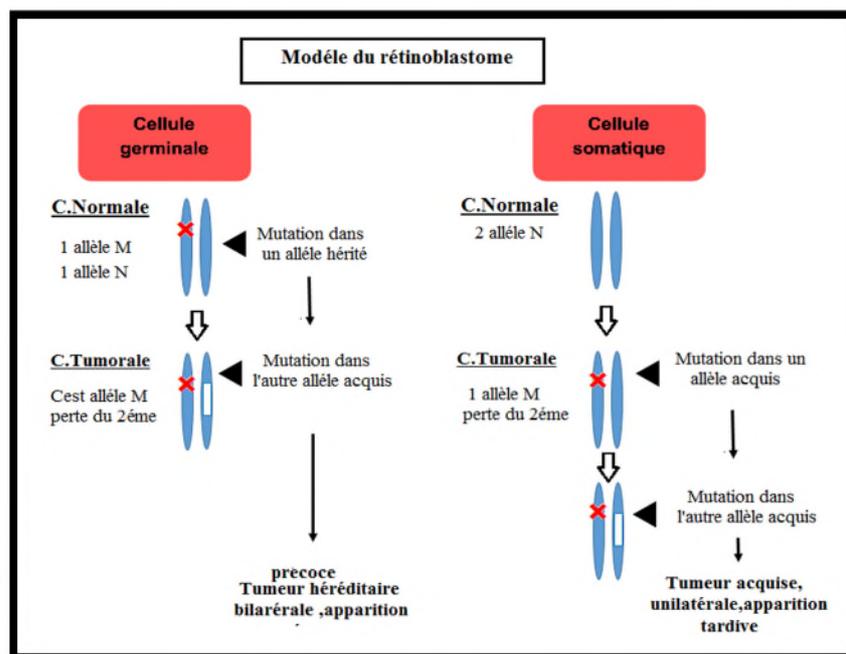


Figure 6 : la théorie de Knudson dans le développement des tumeurs (*Delahaye , 2008*)

II-2- la cancérogenèse :

La cancérogenèse est l'ensemble des phénomènes menant à la transformation d'un tissu physiologique sain en tissu cancéreux suite à une succession d'étapes irréversibles qui peuvent se chevaucher dans le temps pour aboutir à l'apparition de la maladie et à son évolution éventuelles sous formes de métastases (*Badid, 2012*).

• L'initiation :

Une lésion du génome se transmet de façon irréversible lors de la division cellulaire et peut persister dans l'organisme pendant de nombreuses années à l'état latent (*Badid, 2012*). La cellule initiée homéostasie de croissance perturbée noté par une insensibilité à des signaux inhibiteurs de la croissance, de la différenciation ou de la mort cellulaire programmé (*Florian, 2002*).

• la promotion :

La promotion correspond à une prolifération clonale de la cellule transformée suite à une exposition prolongée, répétée ou continue à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiale, elle correspond à une cascade d'étapes permettant à la cette cellule d'atteindre le stade d'une tumeur histologiquement détectable (*Emily, 2006*).

• la progression :

À ce stade la cellule a totalement échappée aux mécanismes de régulation gérés par l'organisme, elle correspond à l'acquisition progressive de caractéristique de plus en plus malignes (*Scotté et al, 2002*) et une résistance aux défenses naturelles de l'organisme. Au cours de cette phase il y'aura la formation de nouveau vaisseaux destinés à répondre aux besoins métaboliques de la tumeur (*Ravand, 2007*).

• L'invasion :

L'invasion se traduit par un franchissement de la lame basale et une infiltration des tissus avoisinants. Ce mécanisme met en jeu une succession d'évènements moléculaires et cellulaires (*Desmetz C, 2004*). Il s'agit de la formation des métastases, selon la théorie de la graine et du sol introduite par Stephan Paget en 1889 (*Méjean et al. 2008*), via la circulation sanguine ou lymphatique suite à la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales en modifiant les propriétés d'adhésion des cellules en *prolifération* (*Wiebrands, 2010*).

II-3- Propriétés des cellules cancéreuses :

Les cellules tumorales partagent des propriétés communes qui les différencient des cellules « normales » (*Hanahan et Weinbergen, 2011*).C

Cependant, (*Hanahan et Weinbergen, 2000*) ont montré que la majeure partie des cellules cancéreuses, si ce n'est pas toutes présentent six modifications essentielles ; et en 2011, avec l'ensemble de leurs recherches effectuées sur les différents types de cancers, ils ont enrichie cette ensemble de caractéristiques par deux autres altérations générales que doivent acquérir les cellules tumorales et les deux autres particularités sont fortement liés (*Laurent ; 2011*).La figure 7 ci-dessous représente les dix caractéristiques des cellules tumorales.

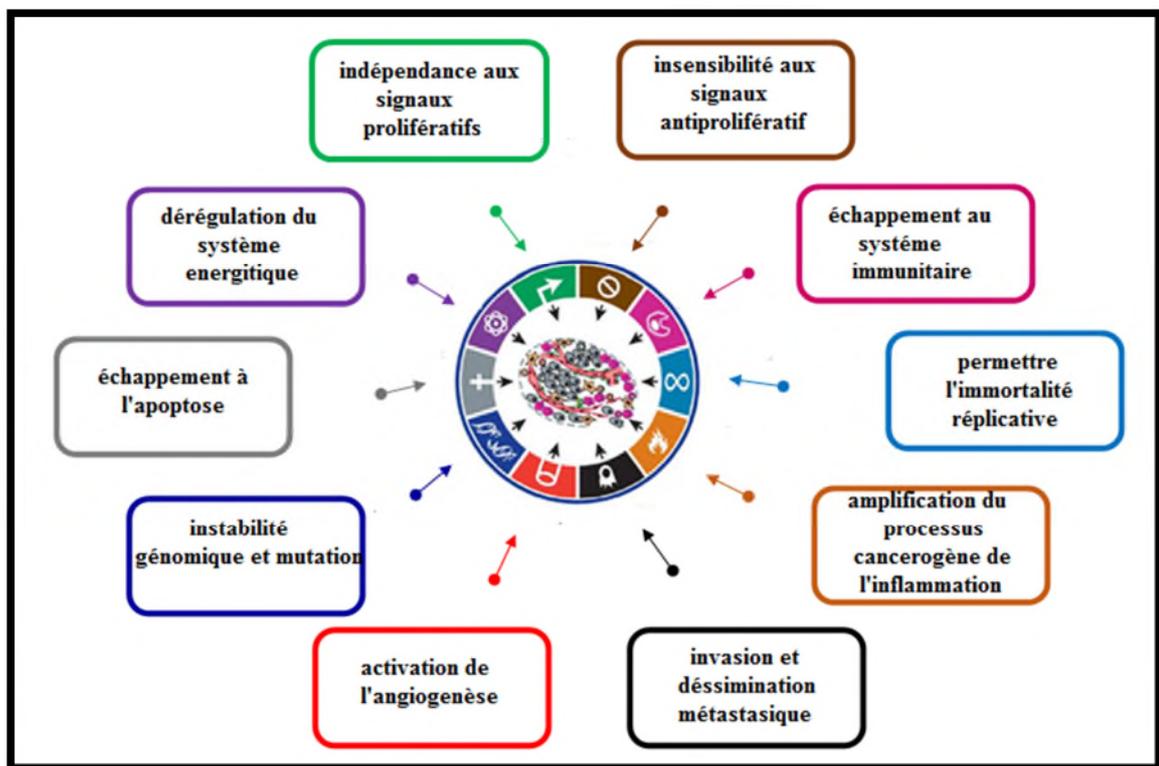


Figure 7 : Les caractéristiques des cellules tumorales (*Adapté de Hanahan et Weinbergen,2011*).

Chacune des dix caractéristiques acquises par les cellules tumorales joue un rôle important dans le processus de la cancérogénèse

Ces principales caractéristiques sont les suivantes :

✚ **Activation des signaux de croissance :** De nombreuses cellules cancéreuses acquièrent la capacité à synthétiser elles-mêmes des facteurs de croissance créant ainsi une boucle de contrôle positive. La synthèse de PDGF et de TGF β par les glioblastomes et les sarcomes en sont un exemple. Dans les tumeurs de l'estomac, des seins ou du cerveau, il a été décrit une sur-expression de EGFR. Cette sur-expression de récepteurs membranaires peut également entraîner une transduction du signal indépendamment d'une fixation ligand/récepteur. Cette transduction indépendante peut également être due à une modification structurale du récepteur le rendant ainsi constitutivement actif (*Laurent ; 2011*).

✚ **Insensibilité des signaux antiprolifératifs :** Les inhibiteurs de croissance permettent de réguler la division cellulaire et ainsi maintenir un nombre constant de cellules dans les tissus. Une grande partie des gènes suppresseurs de tumeurs permettent de réguler la croissance cellulaire et leur prolifération. Parmi ces gènes nous pouvons citer le gène codant pour la protéine rétinoblastome Rb et celui codant pour la protéine P53 qui sont des protéines centrales dans la régulation du cycle cellulaire (*Laurent ; 2011*).

✚ **Potentiel prolifératif illimité :** les cellules tumorales perdent la sénescence répllicative grâce à la surexpression de la télomérase qui empêche le raccourcissement des chromosomes (*Hanahan et Weinbergen, 2011*).

✚ **Échappement à l'apoptose :** au niveau de la cellule tumorale les protéines impliquées dans le déclenchement de l'apoptose sont réprimées, c'est le cas de la protéine p14 (*Hanahan et Weinbergen, 2000*) ;

✚ **Activation de l'angiogenèse :** Les vaisseaux sont indispensables à la survie des cellules pour leur apporter oxygène et nutriments et évacuer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. Durant la progression tumorale l'angiogenèse est toujours active permettant la croissance des néoplasmes ; Respectivement, le VEGFA et la TSP1 sont les acteurs les plus connus dans l'induction et l'inhibition de l'angiogenèse (*Laurent ; 2011*).

✚ **L'invasion et métastases :** Pendant le développement de nombreux types de cancer, les cellules de la tumeur primaire envahissent les tissus adjacents et des sites distants. Les mécanismes d'invasion et de migration des cellules tumorales se basent sur un processus décrit pendant le développement embryonnaire chez de nombreuses espèces et permet aux cellules de migrer vers les organes en formation, il s'agit de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (*Laurent ; 2011*).

✚ **Dérégulation du métabolisme énergétique :** les cellules cancéreuses augmentent l'expression des gènes codant pour les transporteurs du glucose, afin de maintenir leur croissance et leur prolifération (*Hanahan et Weinbergen, 2011*).

✚ **Susceptibilité importante aux dommages de l'ADN :** les cellules cancéreuses ont une grande instabilité génomique favorisée par leur multiplication illimitée et l'altération des systèmes de réparation des lésions de l'ADN (*Hanahan et Weinbergen, 2012*).

✚ **Échappement au système immunitaire :** la cellule cancéreuse échappe au contrôle exercé par le système immunitaire en sécrétant notamment des facteurs immunosuppresseurs ou en recrutant des cellules inflammatoires dotées d'une activité immunosuppressive (*Hanahan et Weinbergen, 2011*) ;

✚ **Amplification du processus de la cancérogénèse due à l'inflammation :**
L'inflammation contribue à l'amplification du processus de la cancérogénèse en fournissant au microenvironnement tumoral des molécules bioactives telles que des facteurs de croissance ou des facteurs pro-angiogéniques (*Hanahan et Weinbergen, 2012*).

II-4- Tumeurs cérébrales :

II-4- 1- Définition

Une tumeur cérébrale est une excroissance, bénigne ou maligne à l'intérieur de l'encéphale ou l'ensemble de SNC. Elle provient d'une reproduction anormalement rapide des cellules gliales, de la myéline ou des méninges (*Godefroid, 2001*).

Ils ont un comportement différent à celui des divers néoplasmes développés dans les différents compartiments du corps : elles métastasent très rarement vers les autres organes et les symptômes produits sont dus au développement local de la tumeur, c'est pour cela qu'un tissu néoplasique cérébral bénin ou malin est désigné sous le nom de «tumeur cérébrale» mais pas «cancer du cerveau» (*Bauman, 2007*).

II-4- 2- Les symptômes :

L'apparition de symptômes peut être soudaine ou progressive, selon la rapidité à laquelle la tumeur se développe, la topographie (localisation), l'âge du patient (*Schvertzer et al, 1989*). Les symptômes les plus souvent associés aux tumeurs cérébrales sont les suivantes :

- Hypertension intracrânienne (HTIC).
- Céphalées.
- Nausées et vomissement.

- Perte de conscience (*Schvertzer et al, 1989*).
- Aveuglement
- Maux de tête,
- Crise d'épilepsie (*Kal, 2002*)

II-4- 3- Classifications :

La classification peut être réalisée en fonction de plusieurs paramètres. On retrouve les classifications suivantes :

II-4- 3-1 -Classifications selon l'origine tissulaire :

▪ Tumeur cérébral primaire :

Les tumeurs cérébrales dites « primaire » sont celle qui se développe directement à partir des cellules du cerveau et de son enveloppe ayant pour origine une tumeur située à l'intérieur du crâne. Les tumeurs du cerveau se répartissent en gliales (50%) et non gliales (50%) (*Janes, 2006*).

▪ Tumeur cérébral secondaire :

Tumeur cérébral secondaire correspondent à des tumeurs de nature métastatique, constituées de cellules provenant d'un autre organe, le plus souvent des poumons (35%), des seins (17%) et des reins (5%) (*Jürg Hablützel, 2009*) (*Janes, 2006*)

II-4-3-2 - Classifications selon l'organisation mondiale de la santé (OMS):

Les grades établis par l'OMS permettent une classification des tumeurs en fonction de leur malignité (*LSCC, 2009*). En se basant sur les différents critères du diagnostics histologiques, ces tumeurs sont classées en :

- **Grade I :** Correspond à des tumeurs à croissance lente et normalement bien circonscrites, bien qu'elles puissent envahir de grande région du cerveau.
- **Grade II :** ce sont des récidives dotées d'une croissance moyenne. Ce groupe est représenté par les astrocytomes diffus de bas grade et les oligodendrogliomes.
- **Grade III :** ce sont malignes qui correspondent à des astrocytomes anaplasiques et les oligodendrogliomes anaplasiques (*Colle, 2011*).
- **Grade IV :** les tumeurs de ce grade peuvent contenir divers types de cellules qui se multiplient et ont une forte tendance nécrosante spontanée (*kleihues, 2000*). Ce groupe est notamment représenté par des glioblastomes multiformes.

II-5- Les marqueurs tumoraux :

Les modifications des profils d'expression cellulaires au cours du processus de cancérogenèse aboutissent à de nombreuses modifications de synthèses métaboliques, entraînant la perte de certaines fonctions ; ainsi qu'une production excessive de molécules (protéines) synthétisées par le tissu à partir duquel s'est développé le cancer (*William J, 2012*). Les substances qui sont déterminées dans ce processus se nomment : **marqueurs tumoraux** (*Novakovic ,2004*).

II-5-1- Définition :

Un marqueur tumoral (MT) est une substance sécrétée par des cellules cancéreuses ou par des tissus sains en réponse à la présence d'une tumeur, ce paramètre moléculaire se rencontre sur le tissu tumoral ou dans les liquides biologiques tels que le sang et les urines (*Rigaud et al, 2002*).

En majorité, les MT sont des protéines ou des glycoprotéines (CEA, CA 15-3, CA125, CA19-9, APF), plus rarement des hormones (HCG, calcitonine) ou des enzymes (NSE, PSA) (*Zenhausern, 2011*). Ils peuvent être exprimés dans différents cancers ou être spécifiques d'une origine tissulaire précise (*Mouhamed, 2010*), comme le montre le **tableau 1** (*Zenhausern, 2011*).

II-5-2- Caractéristiques d'un marqueur tumoral :

Les caractéristiques les plus importantes d'un marqueur tumoral idéal sont :

- **Une sensibilité** : c'est-à-dire exprimée par tous les cancers d'un type histologique défini (pas de faux négatif).
- **Une spécificité** : c'est-à-dire n'être exprimé qu'en présence de ce type de cancer (pas de faux positif) (*Thyss, 2011*).

II-5-3- L'intérêt des marqueurs tumoraux :

L'intérêt dans la recherche des marqueurs se justifie à plus d'un titre, ils permettent :

- Le diagnostic : si la présence est étroitement liée à un type défini du cancer.
- Le pronostic : si son taux est corrélé au risque métastatique, à la réponse attendue au traitement, à l'espérance de la survie.
- La surveillance : dans la détection des récurrences ou des métastases si une réaugmentation des taux est significativement associée à une reprise évolutive (*Thyss, 2011*).

Tableau 1 : Utilisation clinique de quelques marqueurs tumoraux dans certaines types de tumeurs (*Zenhausern R, 2011*).

Marqueur	Non du marqueur	Tumeur
AFP	Alpha foeto-protéine	Carcinome Hépatocellulaire Tumeurs germinal
CEA	Antigène carcino- Embryonnaire	Cancer du colon Cancer du sein
CA 15.3	Cancer antigène 15.3	Cancer du sein
CA 125	Cancer antigène 125	Cancer de l'ovaire
CA 19.9	Cancer antigène 19.9	Cancer du pancréas Cholangiocarcinome
HCG	hormone chorionique gonadotrope	Tumeur germinal Môle hydatidiforme
PSA	Antigène spécifique de la prostate	Cancer de la prostate
Calcitonine		Cancer médullaire de la thyroïde
TG	Thyroglobuline	Carcinome différencié de la thyroïde

II-5-4- Classification :

Les marqueurs tumoraux sont divisés en deux groupes :

II-5-4-1- les marqueurs de fonction :

Ils peuvent être des hormones, des enzymes ou des composantes cellulaires (*Lavner et al, 2000*). On site :

• HCG (Hormone Chronique Gonadotrope) :

C'est une glycoprotéine synthétisée par le placenta (*Thyss, 2011*), composée de 2 sous unités alpha et bêta. A côté de son élévation au cours de la grossesse, elle peut être augmentée dans le sérum au cours de tumeurs embryonnaires malignes d'origine ovarienne ou testiculaire, le taux de cette hormone est également élevé en cas de tumeur d'origine trophoblastique. Le dosage sérique de l'HCG a dans ces tumeurs une valeur diagnostique, pronostique et dans la surveillance (*Thyss, 2011*).

• NSE (Neurone Spécifique Endolase) :

Est une enzyme glycolytique (*Andrzej prystupa, 2011*) formée d'un dimère de deux sous unités gamma (*Pujol et al, 1998*). C'est un marqueur des proliférations neuro-endocrines comme le neuroblastome, le cancer à cellules claires de la thyroïde et surtout le cancer à petites cellules du poumon où il est élevé dans 70% des cas (*Thyss, 2011*).

• La cytokératine :

Appartient à la famille des filaments intermédiaires, lors de la transformation cancéreuse l'expression des cytokératine augmente avec la conservation de même profil. Ce marqueur a une certaine valeur pronostique dans les cancers bronchiques et leurs surveillances (*Thyss, 2011*).

II-5-4-2- Les marqueurs d'immunité :

Il existe deux types de marqueurs d'immunité :

- ❖ Les antigènes tumoraux : CA19.9, CA125, CA15.3 ...ect
- ❖ Les antigènes onco-fœtaux : ACE, AFP (*Legrand et al, 2008*)

Parmi ces marqueurs, on retrouve :

• Le CA 15. 3 (Cancer antigène 15.3) :

Est une glycoprotéine de haut poids moléculaire présente dans le globule de graisse du lait maternel (*J.F.Heron, 2003*), largement utilisé comme marqueur tumoral pour les cancers du sein (*Mouhamed, 2010*). C'est un marqueur de suivi des malades au cours des traitements (*J.F.Heron, 2003*).

- **ACE** (Antigène Carcino- Embryonnaire) :

Est une glycoprotéine 200 kDa ayant une demi-vie de 2 à 8 jours, retrouvés dans le tractus alimentaire, le foie et le pancréas du fœtus entre le 2^{ème} et le 6^{ème} mois de la vie intra-utérine (*J.F.Heron, 2003*). L'ACE est l'un des marqueurs les plus répandus et le plus fréquent utilisé comme marqueurs dans les cancers gastro-intestinaux, du sein, de l'ovaire et de la prostate et en particulier dans le cancer colorectale (*Mouhamed, 2010*) ou il a une utilité pour le contrôle du traitement et la détection des récives (*Zenhausern, 2011*).

- **AFP** (Alpha Foeto-Proteine) :

C'est une α 1-globuline produite par le foie fœtal, le tractus intestinal et le sac vitellin, joue le même rôle que l'albumine chez l'adulte. Elle est très augmentée au cours du carcinome hépatocellulaire et les tumeurs testiculaires non séminomateuses (tumeurs du sac vitellin). Sa demi-vie est de 5 à 6 jours (*J.F. Heron, 2003*).

II-5-5- Les marqueurs de tumeurs cérébrales :

- ❖ **S-100** :

Sont des holoprotéines dimériques de 21 kDa, se composant d'une sous unité alpha et une sous unité bêta, sécrétée pas les cellules astrocytaires et les cellules de la gaine de Schwann (*Benabdesslam et al, 2007*). Elle est impliquée dans le contrôle calcique des cellules gliales (*Raponi, 2005*).

Cette protéine est peut être appliquée comme marqueurs des patients atteint de glioblastomes et d'astrocytomes, sa concentration normale dans le sérum est en dessous de 0,3ng/ml (*Radiol, 2004*).

- ❖ **Olig 1 et olig 2** :

Ce sont des facteurs de transcription (*Ruth et al, 2008*) exprimés par les progénitures oligodendrocytaires à tous les stades de développement. Ils pourraient servir comme marqueurs des oligodendrogliomes (*Richard, 2004*). La surexpression de ces facteurs permet de déterminer le développement des oligodendrogliomes et des glioblastomes dérivés de cette lignée (*Richard Lu et al, 2001*).

- ❖ **GFAP** (Proteine Gliale Fibrillaire acide) :

Est une protéine majeure de cytosquelette des cellules astrocytaires (*Beaudeau JL, 2008*). La surexpression de GFAP est significative au développement des astrocytomes (*Richard Lu et al, 2001*).

❖ VEGF (Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire) :

Est une protéine dont le rôle est de déclencher de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse), elle est impliquée dans le développement des cancers (*Kerbel et al, 2008*). La surexpression de ce facteur est signalée dans le cas des tumeurs cérébrales (*Wager et al, 2008*).

❖ EGFR (Récepteur de Facteur de Croissance Epithélial) :

Est un facteur de pronostic chez les patients plus âgés (> à 75ans) atteints d'une tumeur cérébrale (*Wager et al., 2008*)

III- Les liquides biologiques :

III-1- Le sang :

Le sang est un liquide visqueux alcalin d'un pH de 7,35 à 7,45 et d'une viscosité comprise entre 4 et 6 à une température de 38°C (*Balcells, 1998*). Il est opaque et sa couleur varie en fonction de son oxygénation, son volume représente 8 % du poids du corps (*Bendjebba, 2004*).

Si on centrifuge un échantillon de sang, les éléments figurés les plus lourds se déposent au fond de l'éprouvette et le plasma flotte à la surface (*Marieb, 2008*). Comme le montre la figure ci-dessous :

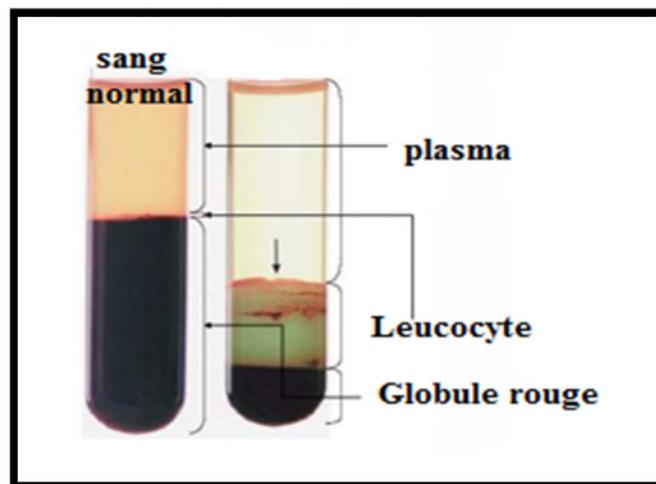


Figure 8 : Composition du sang (*Delabesse E, 2011*)

La centrifugation est réalisée par le ficoll qui permet de mieux séparer les trois phases du sang mentionné dans l'image

La majeure partie de la masse rougeâtre accumulée au fond de l'éprouvette est composée d'érythrocytes ou globule rouge, dans la fonction est de transporter l'oxygène. Une couche leucocytaire, se forme à la surface de séparation des érythrocytes et du plasma et constitue un des moyens de défense de l'organisme. Les plaquettes qui interviennent dans la coagulation (*Marieb, 2008*).

Le plasma sanguin est un liquide clair, jaunâtre. il est composé d'environ :90% d'eau, 8% des protéines (albumine et globuline) et 2% de petites molécules : ion, glucose ,vitamine , hormone, enzyme, urée, acide urique ,créatinine et d'autres produits du métabolisme (*Menche, 2006*).

Parmi les protéines sériques on distingue essentiellement l'albumine et les globulines de différents types :

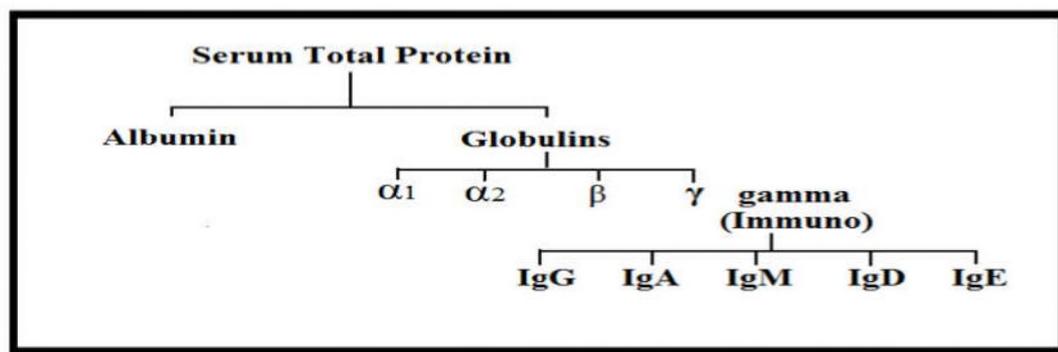


Figure 9 : Les principales protéines sériques (*Goran, 2009*).

Les principales protéines sériques sont l'albumine et les globulines qui sont divisées en alpha 1 et 2, bêta et gamma, ces dernières regroupent les immunoglobulines : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE.

La protéine la plus abondante du plasma est l'albumine avec une concentration comprise entre 35 et 50 mg/ml (*Dubois, 2008*) et celle des globulines est entre 25 et 35 mg/ml (*Gorand, 2009*). L'augmentation ou la diminution de ces concentrations sont à l'origine des problèmes pathologiques (*Verimli et al, 2000*).

III-2- Les urines:

L'urine est un liquide biologique jaunâtre secréter par le rein, son pH est légèrement acide (*Marieb, 2008*). Il est composé de plus de 95% d'eau (*Richert et al, 2011*), les 5% restants représentent les composés organiques : l'urée, la créatinine, l'acide uriques l'acide hippurique et l'urobilirubine (*Aubron et al, 2012*), et des solutés minéraux tels que le chlorure, sodium, potassium, calcium, ammonium, phosphate et le sulfate (*Ousalem et al, 2008*).

La concentration des protéines totaux dans les urines est de 0,06 g/l, Une augmentation de cette concentration peut être décelée dans la plus part des maladies rénal (*Dénis et al ; 2006*).

III-3-La filtration du sang et la formation des urines :

III-3-1- Le rein :

Le rein est un organe en forme d'haricot (*Marieb, 2008*), situé en arrière de péritoine (région rétro-péritonéale), sa structure est organisée en plusieurs milliers d'unités fonctionnelles appelées néphrons (*klein, 2009*). Un néphron est constitué d'une unité de filtration, le glomérule, suivi par un tubule dans lequel s'effectuent les remaniements de l'urine en cours de formation. Sur le plan anatomique le rein est divisé en 3 parties:

- Le cortex rénal
- La médulla rénal
- Pelvis rénal

III-3-2- Les fonctions du rein:

Le rein assure plusieurs fonctions essentielles pour l'organisme :

- Il épure l'organisme de ces déchets endogènes (urée, ammoniacque ...) ou exogène (médicaments, pesticides ...) (*Klein, 2009*).
- Récupérer les composants indispensables qui ont filtrés pour les retourner dans le sang (*Massé, 2011*).
- Sécrétion d'érythropoïétine (EPO) (*Massé, 2011*) et de la rénine (*Klein, 2009*).
- Assure l'équilibre de l'eau et de nombreux ions (sodium, potassium, calcium ...) ce qui permet le contrôle de pH et la pression sanguine (*Klein, 2009*).

III.3.3. La formation des urines :

Trois processus fondamentaux concourent à la formation de l'urine : la filtration glomérulaire, la réabsorption et la sécrétion tubulaire (*Joseph, 2000*).

▪ **La filtration glomérulaire :** est un processus passif à l'eau et aux solutés de faible poids moléculaire et restriction sélective aux passage des molécules supérieur à 60 KDa, cette filtration est assuré grâce à la barrière de filtration glomérulaire (BFG). Le filtra est formé essentiellement du plasma sanguin dépourvu de protéines plasmatique (*Klein ; 2009*) (*Marieb, 2008*).

▪ **La réabsorption tubulaire :** le filtrat quitte le glomérule pour passer dans le tubule (*Klein ; 2009*), outre les déchets et les ions en excès doivent être éliminés du sang. Le filtrat contient un grand nombre de substances utiles (notamment de l'eau, du glucose, des acides aminés et des ions) qui doivent être réabsorbés et renvoyés dans le sang (*Marieb, 2008*).

▪ **La sécrétion tubulaire :** des substances telles que les ions H^+ et les ions K^+ et la créatinine passent au filtrat en pour être éliminées dans les urines (*Marieb, 2008*).

Toute modification de l'un ou de plusieurs de ces processus entraîne l'altération de la fonction rénale, qui se traduit biologiquement par l'apparition de protéines urinaires normalement absentes ou de protéines en concentration anormalement élevée (*Bricon ,2002*).



Matériels et



méthodes

A decorative flourish consisting of a horizontal line with intricate, symmetrical scrollwork and floral motifs at both ends.

Méthodes d'analyse

protéiques

A decorative flourish consisting of a horizontal line with intricate, symmetrical scrollwork and floral motifs at both ends, mirroring the one above.

I- Les méthodes colorimétriques :

I-1- la méthode de Bradford :

- **Principe**

La méthode de Bradford développée en 1976 est un dosage colorimétrique basé sur le changement de l'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les protéines. C'est une méthode quantitative qui permet de doser des protéines même à l'état de traces (faibles concentrations), elle est relative et nécessite de tracer une courbe d'étalonnage (**Bradford, 1976**).

- **Les solutions utilisées :**

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford nécessite l'utilisation de trois solutions différentes :

1. Une solution de l'échantillon dont on veut déterminer la concentration.
2. Une solution de concentration connue d'une protéine considérée comme une référence ou un standard par rapport à la protéine dont on veut déterminer la concentration. Cette protéine de référence peut être la même protéine que celle que l'on veut doser.
3. Le réactif de Bradford qui développe une coloration en réagissant avec des acides aminés spécifiques de ces protéines. Le même volume de cette solution est rajouté dans les mêmes conditions dans tous les tubes de la gamme étalon et aussi dans les tubes contenant l'échantillon à doser (**Pandey et Budhathoki, 2007**).

La mesure de l'absorbance de la gamme étalon permet de tracer une droite qui représente les valeurs de l'absorbance en fonction de la concentration et on obtient l'équation : $y = \alpha x + \beta$ y : absorbance x : concentration β : coefficient de déviation (**Pandey et Budhathoki, 2007**).

La détermination de la concentration de l'échantillon consiste à mesurer son absorbance et à calculer ensuite sa concentration en utilisant l'équation obtenue lors de l'étalonnage (**Pandey et Budhathoki, 2007**).

- **La solution de bleu de Coomassie :**

Le bleu de Coomassie G 250 est un constituant du réactif de Bradford, c'est un colorant non spécifique, il se lie avec toutes les protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 3 KDa (**spitz, 2006**).

A l'état libre il se caractérise par une forme cationique, une couleur entre le rouge et le marron et le spectre d'absorbance maximal est entre 465 et 470 nm ; le colorant une fois lié

aux protéines, change sa forme cationique en une forme anionique, sa couleur devient bleu et son absorbance est mesurée à 595 nm. La figure 21 ci-dessous représente la structure d'une molécule de bleu de Coomassie G 250 (Owusu-Apenten, 2002).

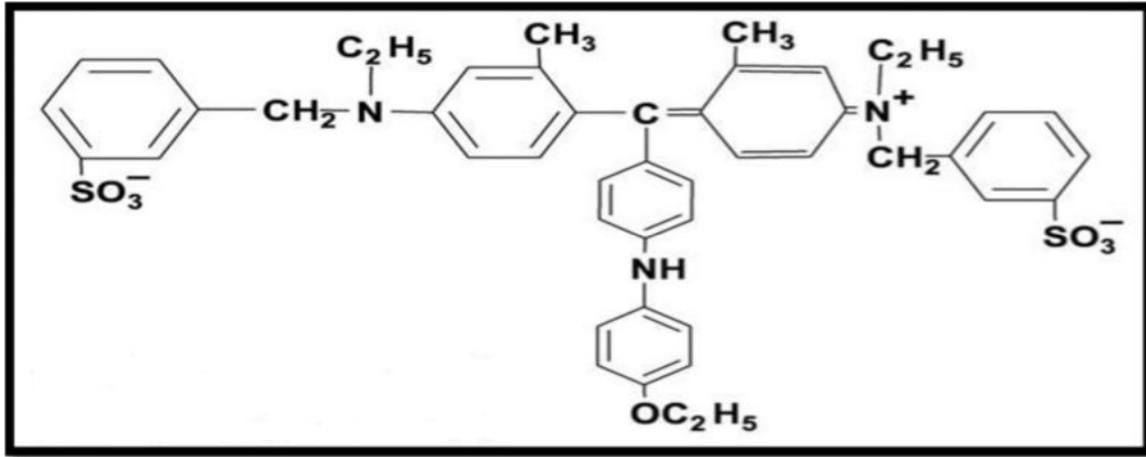


Figure 10 : la structure d'une molécule du bleu de Coomassie (Owusu-Apenten ; 2002).

Les molécules de ce réactif se lient fortement avec les résidus chargés positivement (Arginine, Lysine et Histidine), par des liaisons ioniques entre les groupements chargés positivement des acides aminés basiques et les groupements sulfonates chargés négativement de bleu de Coomassie. Ce dernier se lie également avec les acides aminés aromatiques (Phénylalanine, Tyrosine et Tryptophane) par des liaisons hydrophobes ou par les forces de Van Der Waals (Van Hold et al., 2006).

La méthode de Bradford est une méthode simple, rapide qui donne des résultats avec une grande sensibilité, en plus, elle nécessite un seul réactif et elle n'est pas coûteuse (Lott et al. 1983).

Il existe aussi d'autres méthodes colorimétriques qui permettent la détermination de la concentration en protéines, les plus courantes sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : les plus courantes méthodes colorimétriques

Méthode	Bradford	Biuret	Lowry
Référence	Bradford, M. (1976) Anal. Bidoche. 72, 248 - 256	Gornall et al. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751	Lowry et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 251
Réactif	Le bleu de Coomassie (s'adsorbe sur le verre des cuves qu'il faut nettoyer fréquemment)	Le biuret (NH ₂ -CO-NH-CO-NH ₂)	Le biuret et le réactif de Folin-Ciocalteu(phosphomolybdate et phosphotungstate - 1927)
Groupements réactifs	Réaction avec l'Arg et, dans une moindre mesure, avec l'His, la Lys et les acides aminés aromatiques	Formation d'un complexe pourpre avec la liaison peptidique en présence de cuivre à pH basique	Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec la Tyr et le Trp et, dans une moindre mesure, avec la Cys, l'His et la liaison peptidique
λ mesure	595 nm (bleu de Coomassie seul : 465 nm)	545 nm (ou 300 nm)	745 nm
Sensibilité	Elevée (seuil = 1 µg)	Faible (seuil = 100 µg)	Elevée (seuil = 1 µg)
Rapidité et complexité	Méthode simple et très rapide	Méthode simple et moyennement rapide	Méthode moyennement simple et moyennement rapide
Interférence	Dosage peu influencé par la présence d'autres molécules sauf les détergents et les bases fortes	Dosage influencé par les autres solutés	Dosage fortement influencé par les autres solutés.
Variation d'une protéine à une autre	Forte : la protéine de référence (l'albumine de sérum bovin ou BSA, " <i>Bovine SerumAlbumin</i> ") est une protéine globulaire peu représentative de l'ensemble des protéines La γ-globuline, parfois employée, est une protéine qui est une meilleure protéine de référence.	Faible : la formation du complexe est à peu près équivalente pour toutes les protéines puisque le biuret réagit avec la liaison peptidique	Forte

II- Les méthodes non colorimétriques :

II-1- L'électrophorèse :

Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec *phoros*, qui signifie « porter d'un côté à l'autre » (Querci, 2005). La migration d'ions chargés peut être mobilisée soit par attraction, soit par répulsion. De manière pratique, la cathode et l'anode sont placés dans une solution électrolytique. Dès l'application du champ électrique, les cations (positifs) vont s'orienter vers la cathode tandis que, les anions (négatifs) seront attirés par l'anode. Les molécules neutres, en revanche ne seront attirées par aucune des électrodes (Vieillard, 2006).

• Principe de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS :

L'électrophorèse SDS-PAGE, repose sur la séparation de molécules chargées dans un champ électrique. Une cuve à électrophorèse est reliée à deux bornes (une cathode (-) et une anode (+) alimentées par un générateur électrique : les molécules que l'on intercale dans ce champ migreront, selon leur charge, vers le pôle complémentaire. (Laemmli, 1970).

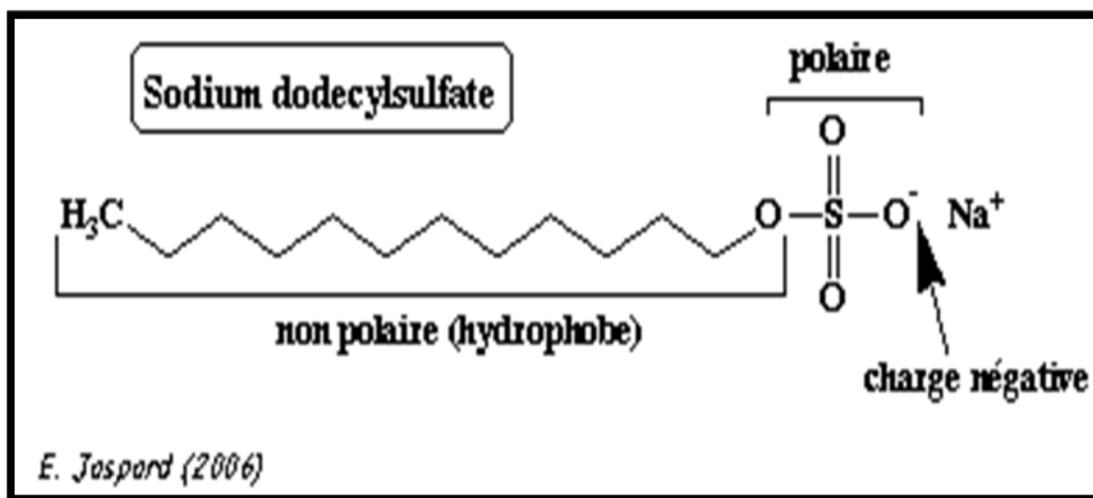


Figure11 : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel électrophorèses ou (SDS-PAGE) (Laemmli; 1970)

D'une manière générale, le complexe acrylamide-bis-acrylamide forme un réseau beaucoup plus réticulé, qui sont donc indiqués pour les molécules de masse moins élevées, la réticulation de gel polyacrylamide se fait par polymérisation d'une solution d'acrylamide qui forme des chaînes avec le bis-acrylamide qui lie ces dernières entre elles (Camus, 2009) ; la **figure 12** montre la formation du complexe acrylamide-bis-acrylamide :

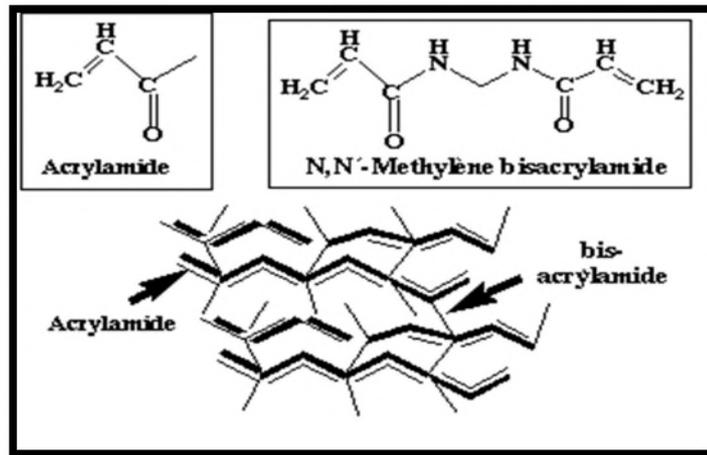


Figure 12 : Formules développées de l'acrylamide et du bis-acrylamide (Rodat, 2009)

En fonction de la taille des pores, on peut donc efficacement séparer des molécules selon leurs masses moléculaires et adapter la réticulation du gel à l'échantillon traité en choisissant la concentration du produit (voir **tableau 3**) :

Tableau 3 : Gamme de séparation des molécules en fonction de la concentration en acrylamide (Camus, 2009).

Pourcentage d'acrylamide	Gamme de séparation en kDa
7,5 %	45-400
10%	22-300
12%	13-200
15%	25-100

Le gel est coulé, en deux étapes, entre des plaques de verre fixées (**figure 13**) sur un support :

- ❖ La partie inférieure du gel, appelé "gel de migration" est celui au niveau duquel la séparation va avoir lieu.
- ❖ La partie supérieure du gel, dans lequel un peigne est enchâssé pour former des puits, est appelé "gel de concentration" (**Gillet, 2007**).

Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant des puits. La taille et le nombre de dents des peignes sont variables, ce qui permet de déposer des volumes allant de 20 μ l à 200 μ l d'échantillon de protéines à séparer. Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse. Le tampon conducteur (électrolytes) est mis dans la cuve, et la migration des échantillons de protéines dénaturées s'effectue sous l'action d'un champ électrique à un voltage de 100 à 150 V (**Gillet, 2007**).

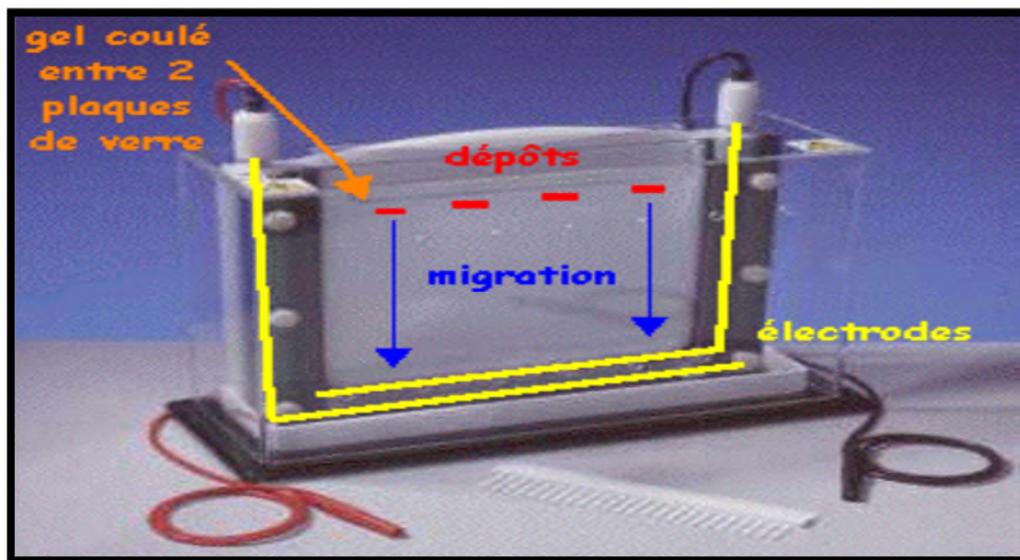


Figure 13 : la mise en place de l'électrophorèse (**Gillet ; 2007**)

L'électrophorèse est arrêtée lorsque le colorant approche de l'extrémité inférieure du gel de migration. Les protéines fixés dans le gel sont révélées par une coloration de bleu de Coomassie ou de nitrate d'argent pour obtenir enfin des différentes bandes pour chaque puits (**Gillet, 2007**).

Il existe d'autres types d'électrophorèses, classé selon le type du support utilisé, le tableau ci-dessous résume ces différents types :

Tableau 4 : les différents types d'électrophorèses (*Camus, 2009*)

Type d'électrophorèse	Montage	Type du support	Principe de séparation	Domaine d'application
Électrophorèse sur papier	horizontal	Papier filtre ou acétate de cellulose	en fonction de leurs charges	Acides aminés protéine ou nucléotide Peptide
Électrophorèse sur gel	horizontal	Agarose	Gel-filtration (grosses molécules ralenties par rapport aux petites) Mobilités électrophorétique des molécules	Protéine Antigénique
	vertical	Gel de polyacrylamide	Selon la charge et le point moléculaire	Protéine Acide nucléique de petite taille

• **Les avantages :**

Cette technique présente de multiples avantages tels que :

- La séparation de molécules multimériques entières.
- Une interprétation délicate (**Camus, 2009**)
- Méthode simple et peu couteuse.
- Applicable aux petites et grandes molécules (**Chatti, 2010**)

II-2- La spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) :

Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Hershel, ces radiations sont situées entre la région du spectre visible et des ondes hertziennes. Le domaine IR s'étend de 0.7 μm à 50 μm . Il est arbitrairement divisé en trois catégories, le proche IR (0.7 à 2.5 μm), le moyen IR (2.5 à 25 μm) et le lointain IR (25 à 50 μm) (Essendoubi, 2007).

•Principe:

Le spectre IR-TF d'une molécule donnée, est composé d'un ensemble des bandes d'absorption de liaisons atomiques ; le spectre d'un échantillon biologique complexe est la superposition des spectres de toutes ces molécules (aspect qualitatif) et en fonction de leurs concentration (aspect quantitatif) (Petibois et al. 2000).

Lors de la vibration de la molécule, l'espacement entre les charges et leurs répartitions changent et elles interagissent avec le champ électrique du rayonnement infrarouge (Essendoubi, 2007).

Comme il est montré dans la **figure 14 (Road, 2001)** les spectres sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre IR-TF, il est constitué d'une source lumineuse, un interféromètre, un porte échantillon, un détecteur et un convertisseur analogique numérique correspondant à la transformée de Fourier ; l'interféromètre est constitué d'un miroir fixe M1, un miroir mobile M2 et une lame séparatrice S (Manca, 1999).

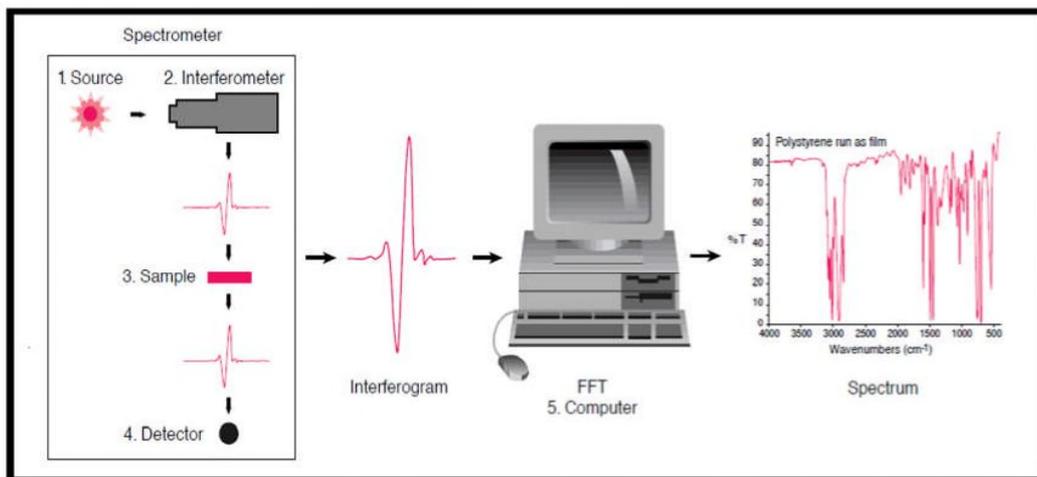


Figure 14 : Principe de la spectroscopie IR-TF (Road, 2001).

La moitié du faisceau lumineux est transmise vers le miroir M1 et l'autre moitié vers le miroir M2, après réflexion sur les deux miroirs, les deux parties du faisceau lumineux se recombinaient au niveau de la séparatrice et passe par l'échantillon, certaines radiations sont absorbées par ce dernier et les autres le traverse (**figure 15**); l'interférogramme qui correspond au signal obtenu de la distribution spectrale de la source lumineuse et l'absorbance de l'échantillon est recueilli et amplifié par le détecteur, le convertisseur (transformée de Fourier) transforme le signal analogique (l'interférogramme) en un signal numérique manipulable par le système informatique (**figure 16**) (**Road, 2001**).

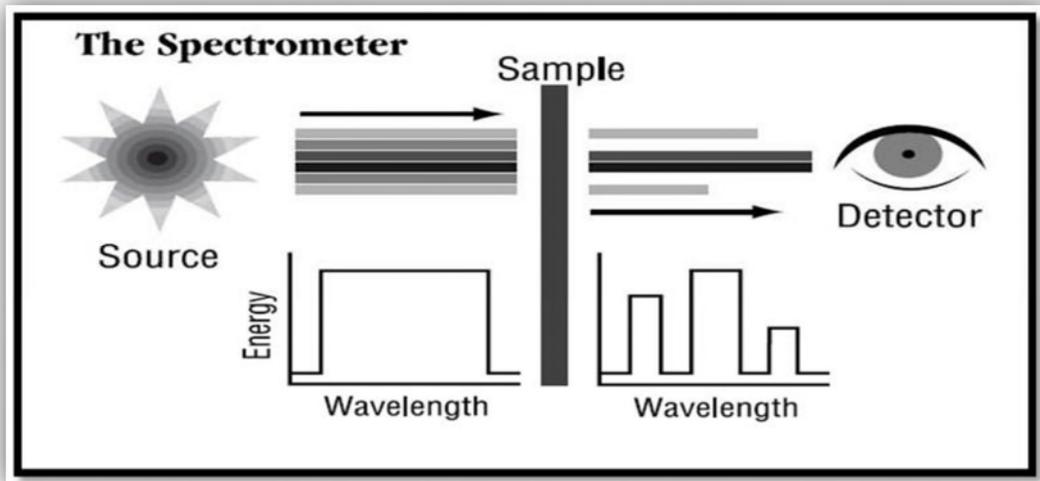


Figure 15 : Le devenir des radiations IR émises (**Road, 2001**)

Une partie des radiations IR émises est absorbée par l'échantillon et l'autre le traverse ; le détecteur recueille le signal d'absorption et d'émission sous forme d'un interférogramme.

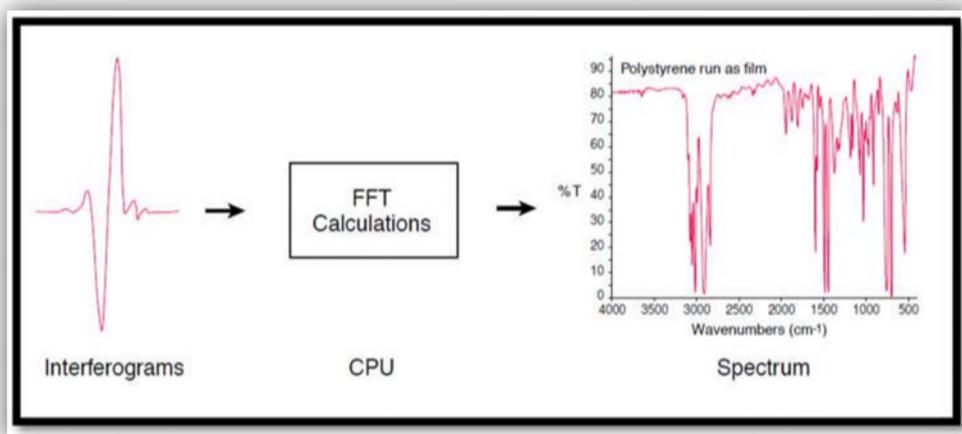


Figure 16: Conversion d'interférogramme en spectre (**Road, 2001**)

Le signal obtenu ne peut pas être interprété sous forme d'interférogramme, il est converti par la transformée de Fourier en un spectre.

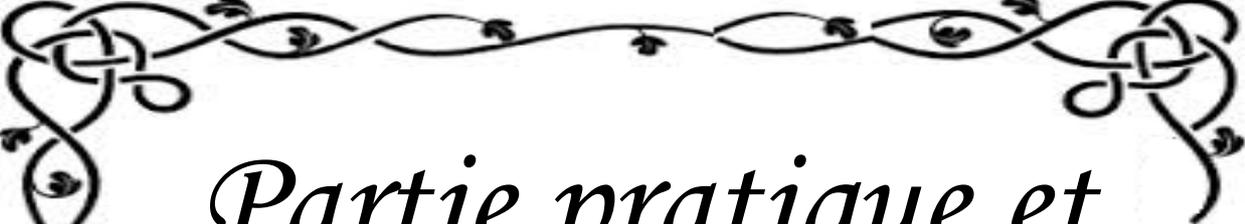
- **Les avantages de (IR-TF) :**

1. **La vitesse** : la plupart des mesures par spectroscopie IR-TF sont faites en quelques secondes ;

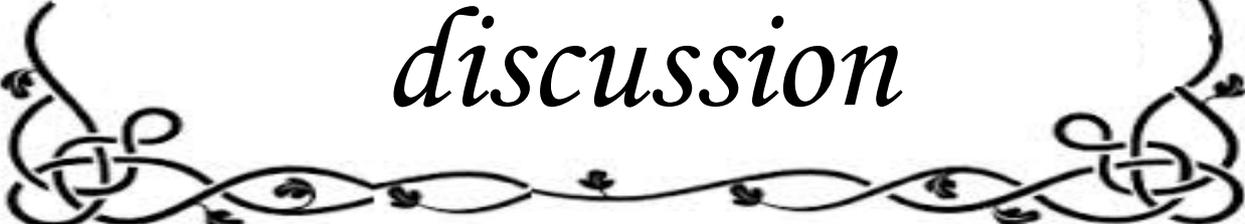
2. **La sensibilité** : les détecteurs utilisés sont beaucoup plus sensibles, la sortie optique est beaucoup plus haute qui a comme conséquence des niveaux plus bas de bruit, cette sensibilité permet de détecter les plus petites molécules ;

3. **La simplicité mécanique** : le miroir mobile est la seule pièce sans interruption mobile dans l'instrument c'est pour cela que la panne mécanique a une possibilité très petite ;

4. **L'instrument** est intérieurement calibré (**Road, 2001**).



*Partie pratique et
discussion*



I- Préparation des échantillons et des solutions :

I-1- Préparation des solutions :

• **Solution de BSA** (Albumine de Sérum Bovin) :

Dans un tube à essai, nous avons préparé 20 ml de la solution de BSA à une concentration de 50 µg/ml.

• **Réactif de Bradford :**

La Préparation de réactif de Bradford nécessite l'utilisation du bleu de Coomassie G250, de l'éthanol (4%) et d'acide phosphorique (10%). La solution obtenue après le mélange de tous ces composés, est soumise à l'agitation pendant 30 min dans l'obscurité ; **la figure 17** montre le réactif de Bradford obtenu



Figure 17: le réactif de Bradford préparé

I-2- Préparation des échantillons :

• **Récupération des échantillons du sang et des urines :**

Nous avons utilisé le sang et les urines de patients atteints des tumeurs cérébrales, ces échantillons sont différents selon le sexe et l'âge, le **tableau** suivant résume Ces différents patients :

Tableau 5: âge et sexe de chaque patient atteint de tumeurs cérébrales

Echantillons	Age (ans)	Sexe
H-38	38	♂
H-11	11	♂
FSG	2ans et 3 mois	♀
F-11/03	11	♀
H-38 SU	38	♂

Remarque : Nous avons 5 échantillons du sang et 4 échantillons d'urines.

• **Centrifugation des échantillons :**

1. Du sang :

Centrifugation des échantillons du sang (**figure 18**) à une vitesse de 3000 g pendant 30 minutes et à 4 °C et récupérer le surnageant de chaque échantillon, en manipulant sous une hotte aspirante à flux laminaire.

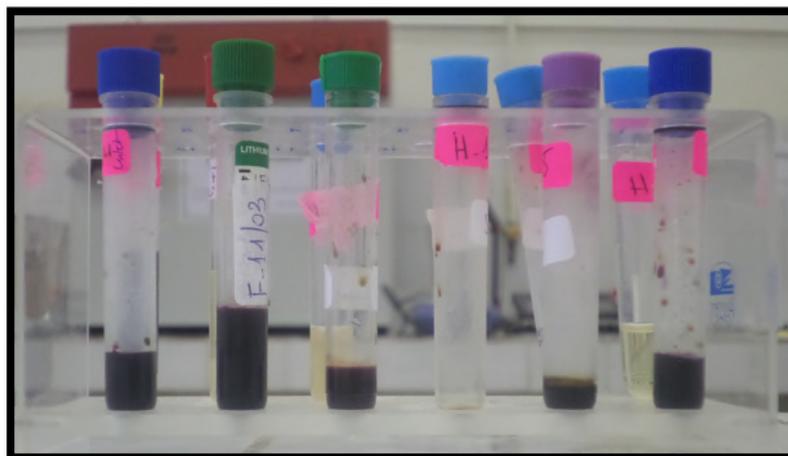


Figure 18 : les échantillons du sang utilisés

2. les urines:

Centrifugation des échantillons des urines (**figure 19**) à une vitesse de 400 g pendant 10 minutes et à 4°C, et nous avons récupéré le surnageant de chaque échantillon.

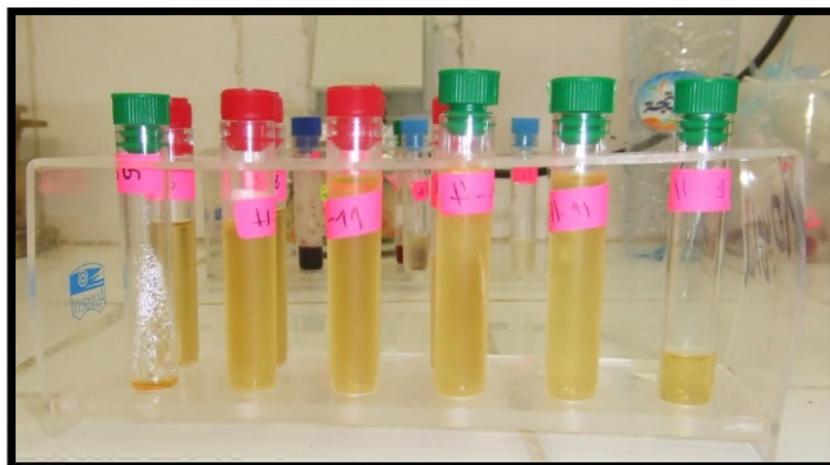


Figure 19: les échantillons des urines utilisés

II- La méthode de Bradford :

II-1- La courbe d'étalonnage :

- La solution mère de BSA à une concentration de 50 µg/ml est utilisée pour préparer cinq solutions étalons contenant respectivement 0, 5, 10, 25 et 50 µg/ml de BSA dans des tubes à hémolyse. Ces différentes solutions servent à la gamme étalon.

- L'addition du réactif de Bradford est effectuée pour chaque tube de BSA préparé précédemment.

- La mesure de l'absorbance des solutions étalons est réalisée dans des cuves par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 596 nm, après incubation pendant 25 minutes à l'obscurité. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau** ci-dessous :

Tableau 6 : les absorbances de la gamme étalon mesurées à 596 nm

Concentrations (µg/ml)	0	5	10	25	50
Δ Absorbances à 596 nm	0	0,050	0,156	0,318	0,542

Absorbance du blanc : 0,466

Suite à ces résultats nous avons tracé la courbe d'étalonnage représentée dans la

figure 20 suivante :

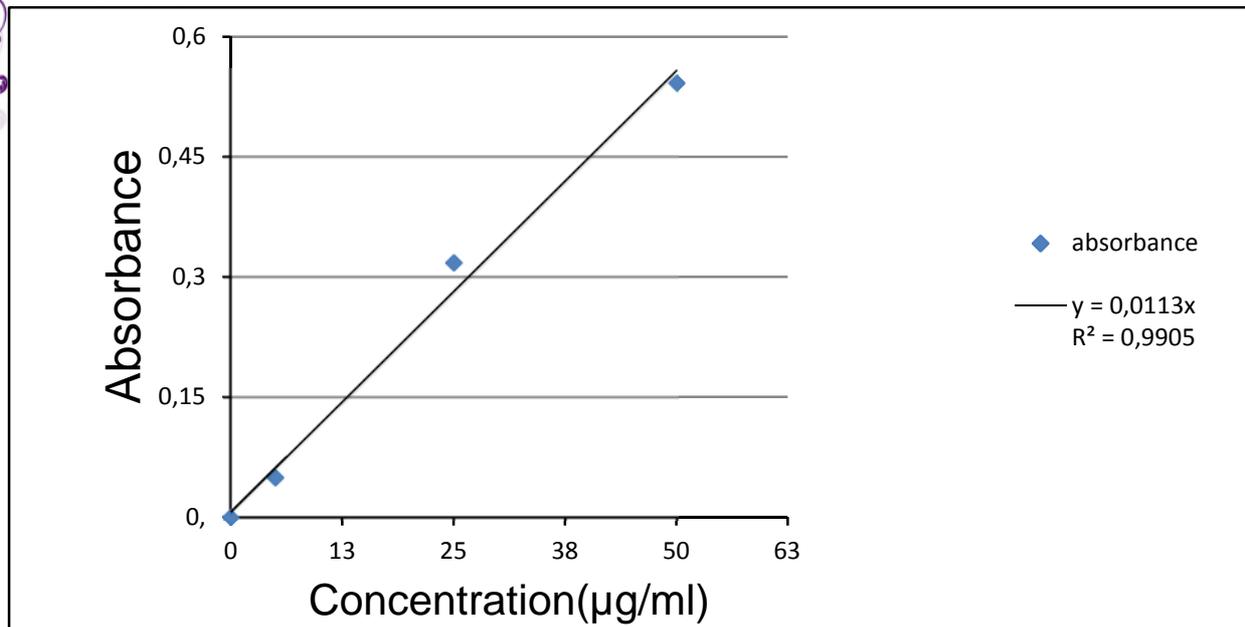


Figure 20 : Résultats de la courbe d'étalonnage.

L'absorbance de la gamme étalon est mesurée à 596 nm après l'ajout de bleu de coomassie aux solutions de la BSA et incubation pendant 25 minutes à l'obscurité.

II-2- Le dosage des protéines dans les échantillons du sang et des

urines :

1- Le sang :

- Dilution des échantillons mère en 1/2.
- Addition de la solution de Bradford aux échantillons dilués.
- Dans des cuves, nous avons introduit 50 µl de chaque échantillon du sang dilué + 1450 µl du réactif de Bradford.
- La mesure de l'absorbance est réalisée par un spectrophotomètre à 596 nm après incubation à l'obscurité pendant 25 minutes. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 7** suivant :

Tableau 7 : L'absorbance et la concentration de chaque échantillon du sang.

Echantillons	Δ Absorbances à 596 nm	Concentrations de la solution mère (mg/ml)
H-38	1,803	319,11
H-11	1	176,98
F-11/03	1,645	291,15
FSG	1,743	308,49
H-38 SU	1,566	277,16

2- Les urines :

- Dilution des échantillons mère en 1/3.
- Ajout de la solution de Bradford aux échantillons dilués.
- Dans des cuves, nous avons introduit 50 ul de chaque échantillon d'urine dilué + 1450ul du réactif Bradford.
- La mesure de l'absorbance était réalisée par les mêmes conditions de longueur d'onde et d'incubation par rapport au sang. Les résultats de l'absorbance obtenus sont représentés dans le **tableau 8** suivant :

Tableau 8: L'absorbance et la concentration de chaque échantillon d'urines.

Echantillons	Absorbances à 596 nm	Concentrations de la solution mère (mg/ml)
H-38	0,271	71,94
H-11	0,302	80,16
FSG	0,520	138,06
F-11/03	0,496	131,68

Partie pratique et discussion

Les résultats obtenus dans les tableaux 7 et 8 nous montrent que :

- Les concentrations protéiques sanguines (CPS) et urinaire (CPU) de nos patients possèdent le même profil c'est-à-dire, que l'augmentation des CPS est proportionnellement relative à l'augmentation de CPU, et ceux-ci sont observés chez tous les patients.

- Les concentrations protéiques sanguines de nos patients varient entre (17,611 et 31,911 g/l), ces dernières sont inférieures que celles des sujets sains qui sont de 60 à 80 g/l ; ces résultats nous permettent de classer les CPS en deux classes :

Classe 1 : une très basse CPS de patient H-11 (17,611 g/l) ;

Classe 2 : une moyennediminution de CPS chez les malades H-38SU (27,716 g/l), FSG (30,849 g/l), F-11/03 (29,115g/l) et H-38 (31,911 g/l).

-Tandis que les concentrations protéiques urinaires chez les mêmes patients varient entre (0,071 et 0,138 g/l) qui sont supérieures à celles des sujets sains qui sont de 0,06 g/l. Ces résultats nous permettent de grouper l'augmentation anormale des CPU en deux niveaux :

-Groupe 1 : une légère augmentation CPU chez l'homme (H-38) de 38 ans qui atteint 0,071 g/l et celle de l'enfant (H-11) de 11 ans qui est de 0,080 g/l.

-Groupe 2 : une forte augmentation de CPU est observée chez la fille FSG de 27 mois et la femme F-11/03 de 38 ans dont elle atteint à 0,138g/l et à 0,136 g/l respectivement.

• Selon les tranches de l'âge et de sexe :

Les concentrations protéiques sanguines et urinaires sont réparties dans le tableau suivant selon leurs différents âges et sexes :

Tableau 9 : Tableau récapitulatif de l'âge, sexe et concentration protéique de chaque patient

Echantillons	Sexe	Age (ans)	Concentrations des protéines (mg/ml)	
			Sang	Urines
H-38	♂	38	319,11	71,94
H-11	♂	11	176,99	80,16
FSG	♀	2ans et 3 mois	291,15	138,06
F-11/03	♀	11	308,49	131,68
H-38SU	♂	38	277,16	/

- **Selon l'âge nous remarquons :**

- **Les patients de 11 ans :**

Une baisse de la concentration des protéines dans le plasma est remarquable notamment, le malade H-11 (**17,699 g/l**) en comparant avec la patiente F-11/03 (**29,115 g/l**) ;

Tandis que on observe une légère augmentation de la concentration protéique urinaire chez le malade H-11 (**0,080 g/l**) comparant à la forte augmentation de cette concentration chez la patiente F-11/03 (**0,131 g/l**)

- **Les patients de 38 ans :**

Une moyenne diminution de la CPS observé surtout chez le patient H-38 (**31,911 g/l**) en comparant à celle du malade H-38SU (**27,716 g/l**) ; Tandis que la concentration protéique urinaire est légèrement augmentée chez le patient H-38 (**0,071 g/l**).

- **La patiente de 2ans et 3mois :**

Une forte augmentation de a CPU observé, qui est de l'ordre de 0,138 g/l et une moyenne diminution de CPS qui atteint 29,115 g/l chez ce bébé.

- Selon le sexe nous observons :**

- **Les femmes :**

Une moyenne diminution de la CPS chez les deux patientes FSG (**30,849 g/l**) et F-11/03 (**29,115 g/l**), et une forte augmentation de la CPU de la fille FSG (**0,138 g/l**) que celle de la patiente F-11/03 (**0,131 g/l**).

- **Les hommes :**

Une forte diminution de CPS des deux patients H-38 (**31,911 g/l**) et H-11 (**17,699 g/l**) et une moyenne diminution observé chez le malade H-38SU (**27,716 g/l**) ; tandis qu'on remarque une légère augmentation de la CPU des patients H-38 (**0,071 g/l**) et H-11 (**0,080 g/l**).

D'une manière générale, l'analyse de la concentration protéique plasmatique et urinaire par la méthode colorimétrique de Bradford, nous permet de détecté une diminution de la concentration protéique plasmatique et une augmentation de la concentration protéique urinaire pour l'ensemble des patients. Toutefois, cette variation de concentration est de différents niveaux, mais elle n'est liée ni au sexe ni à l'âge des patients. Cela suggère que cette variation est peut être lié aux différentes tumeurs cérébrales que les patients peuvent les atteindre ou/et aux divers stades de développement des tumeurs.

• **Le facteur de concentration sang/urines (S/U) :**

Le facteur de concentration sang/urines permet de nous renseigner sur la bonne ou la mauvaise filtration glomérulaire au niveau du rein. En effet, la valeur élevée du facteur R/U s'explique par la bonne filtration glomérulaire et toute fois, la diminution de ce facteur se traduit par le dysfonctionnement de cette filtration ; le tableau suivant montre le facteur S/U calculé de chaque patient :

Tableau 10 : le facteur **Sang/Urines** calculé pour chaque patient.

Echantillons	Concentration des protéines mg/ml		Facteur S/U
	Sang	Urines	
H-38	319,11	71,94	4,43
H-11	176,99	80,16	2,20
FSG	308,49	138,06	2,35
F-11/03	297,16	131,68	2,25

Le tableau ci-dessus montre que :

Le facteur S/U le plus élevé est observé au niveau de le patient H-38 (**4,43**), et ceci indique que la meilleure filtration glomérulaire de nos patients existe chez ce malade ; comme nous remarquons une moyenne valeur chez la femme FSG (**2,35**) suivi par la patiente F-11/03 (**2,25**) et enfin la faible valeur est observé chez l'homme H-11 (**2,20**). La diminution du facteur S/U peut être interpréter par le dysfonctionnement de la filtration glomérulaire et ainsi le fonctionnement rénale.

III- La méthode de l'électrophorèse:

Il s'agit d'une électrophorèse monodimensionnelle en présence du Sodium Dodécyl-Sulfate sur gel polyacrylamide selon la méthode de LAEMMLI (1970) modifiée par SINH et al. (1991) et par AMIOUR et al. (2002).

III-1- Préparation des échantillons :

- Les échantillons du sang et des urines centrifugés précédemment sont recueillis dans des eppendorfs.

- **En premier lieu** : nous avons préparé pour chaque échantillons du sang et d'urine une solution contenant l'échantillon + le tampon de dénaturation à des volumes de 50 μ l v/v dans des eppendorfs (**figure 21**). Le tampon de dénaturation est composée de : solution à base de SDS, un réducteur β -mercaptoéthanol et de bleu de bromophénol. Chacun de ces composés exerce une action dénaturante précise :

* le β mercaptoéthanol : composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle. Les sous unités des protéines sont donc dissociés.

* le SDS (*sodium dodécyl sulfate*): capable de se fixer Sur la périphérie des chaines de protéines tout en leur conférant une charge négative. Ainsi les protéines recouvertes par le SDS auront donc toute une charge négative. Influencées ainsi par le SDS, elles migreront donc toutes vers l'anode (+) : la charge réelle des protéines n'est donc plus mise en jeu et donc seule leur masse moléculaire influencera leur migration. .

-**En seconde lieu** : le contenu préparé de chaque eppendorf est placé dans un bain Marie à 95°C pendant 5 minutes.

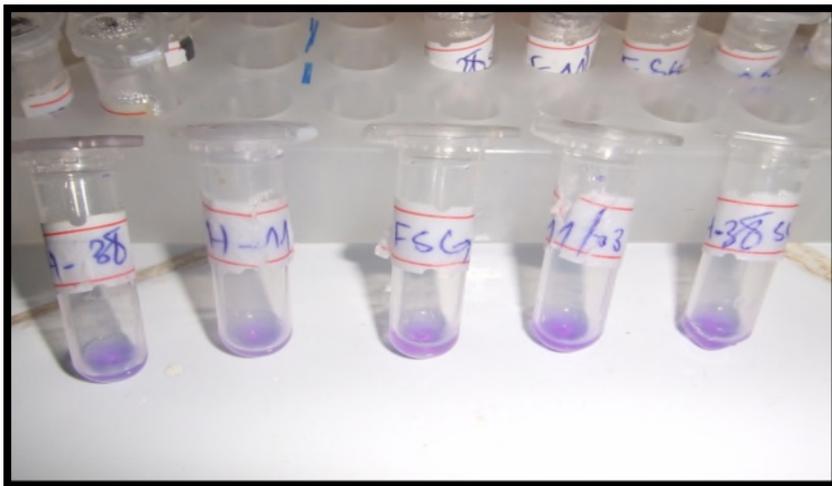


Figure21 : les échantillons préparés pour l'électrophorèse

III-2- Préparation du gels, tampon de migration et solution de coloration et de décoloration :

A- Préparation des gels :

Préparation de deux types de gels : un gel de séparation qui permet de fractionner les différentes protéines selon leurs poids moléculaires et un gel de concentration permettant de retenir les impuretés et de tasser les protéines.

Avant la préparation des gels on a procédé au montage des plaques, après les avoir nettoyées à l'éthanol puis, les placer l'une contre l'autre en les séparant avec deux espaceurs.

• **Le gel de séparation :**

Le gel de séparation est à 10%. Il est constitué d'acrylamide à 30% (p/v), de N-N'-Méthylène-Bisacrylamide à 8% (p/v), de Tris HCL à pH=8.8, de SDS à 10% (p/v) et d'eau distillée. La réaction de polyacrylamide est catalysée par l'ammonium persulfate (APS) à 10% (p/v) et le TEMED ; le **tableau 11** résume les constituants et les volumes prisent pour la préparation de ce gel.

Tableau 11 : Composition chimique du gel de séparation

Gel de séparation 10%	
dH₂O	1,9ml
1,5 M Tris pH 8.8	1,3ml
30% Acrylamide	1,7ml
10% SDS	50ul
10% APS	100ul
TEMED	10ul

• **Le gel de concentration :**

Le gel est préparé de la même façon que le gel de séparation avec une seule différence au niveau du Tris HCL qui a un pH de 6.8 (**tableau 12**).

Tableau 12 : Composition chimique du gel de concentration

Gel de concentration à 5%	
dH₂O	1,4ml
1 M Tris pH 6.8	250ul
30% Acrylamide	330ul
10% SDS	20ul
10% APS	50ul
TEMED	5ul

Remarque : l'ajout des catalyseurs APS et le TEMED s'effectue juste au moment de coulage des deux gels afin d'éviter la polymérisation instantanément.

B- Préparation du tampon de migration :

Le tampon de migration est préparé selon les composants mentionné dans le **tableau 13** puis soumis à une agitation :

Tableau 13: composition chimique du tampon de migration

Tris base	7,56g
Glycine	36g
SDS 10%	40ml
H₂O	250ml

Remarque : le tampon de migration est 10 fois concentré

C- Solution de coloration et de décoloration :

• **Solution de coloration :**

La solution de coloration sert à mettre en évidence les bandes de protéines migrantes pour les visualisés, cette solution est préparée en mélangeant les composés représenté dans le **tableau14:**

Tableau14: la composition chimique de la solution de coloration

Méthanol	45%
Acide acétique	10%
Eau distillé	45%
Bleu de Coomassie R 250	3g/l

- **La solution de décoloration :**

La solution de décoloration ou de lavage permet d'éliminé l'excès de protéines dans le gel, elle est préparée par les composés suivant :

Tableau15: la composition chimique de la solution de décoloration

Méthanol	20%
Acide acétique	10%
Eau distillé	70%

III-3- La réalisation de l'électrophorèse :

Avant la préparation les gels on a procédé au montage des plaques, après les avoir nettoyées à l'éthanol puis, les placer l'une contre l'autre en les séparant avec deux espaceurs.

- Le gel de séparation est coulé entre les deux plaques doucement pour ne pas produire de bulles, jusqu'à un niveau délimité (environ 4 cm de l'encoche).

Quelques gouttes d'isobutanol sont additionnées pour égaliser la surface du gel et au bout de quelque minute ce dernier prend sa forme. L'isobutanol est débarrassé par un papier absorbant et rincera l'eau distillée.

- Le gel de concentration est ensuite coulé sur le gel de séparation et le peigne est posé directement d'une manière bien centrée entre les plaques.
- Après polymérisation du gel, tout le dispositif est placé dans la cuve d'électrophorèse, et la remplir avec le tampon de migration jusqu'à la limite (max fil). le peigne est alors retiré délicatement en formant les puits.
- A l'aide d'une micropipette, le dépôt des échantillons préparés est effectué l'une après l'autre sur les puits formés.

Partie pratique et discussion

- La cuve est fermée par le couvercle qui porte les électrodes raccordé à un générateur dans les conditions de migration (150 V, durée de 120 min).
- La vérification du bon fonctionnement de la migration se traduit par l'apparition de fines bulles à l'intérieur de la cuve ,la **figure22** résume la mise en place de l'électrophorèse :

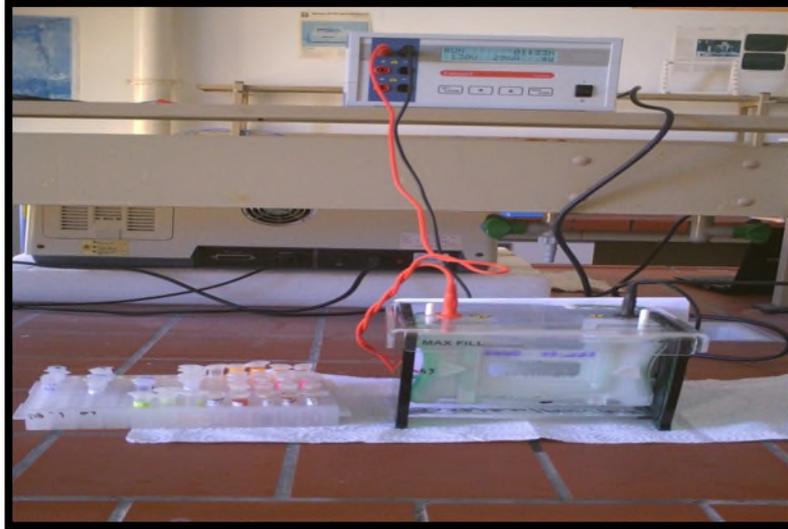


Figure 22 : La mise en place de l'électrophorèse

• L'électrophorèse est arrêtée lorsque le colorant atteint le front inférieur du gel, ce dernier est récupéré dans un bac en plastique rempli de la solution de coloration pendant 45 minutes.

• Après la coloration, le gel est trempé dans la solution de décoloration pendant 20 à 30 min avec de légères agitations, et changer la solution trois fois ; les résultats de migration obtenus sont observés dans la figure ci-dessous :

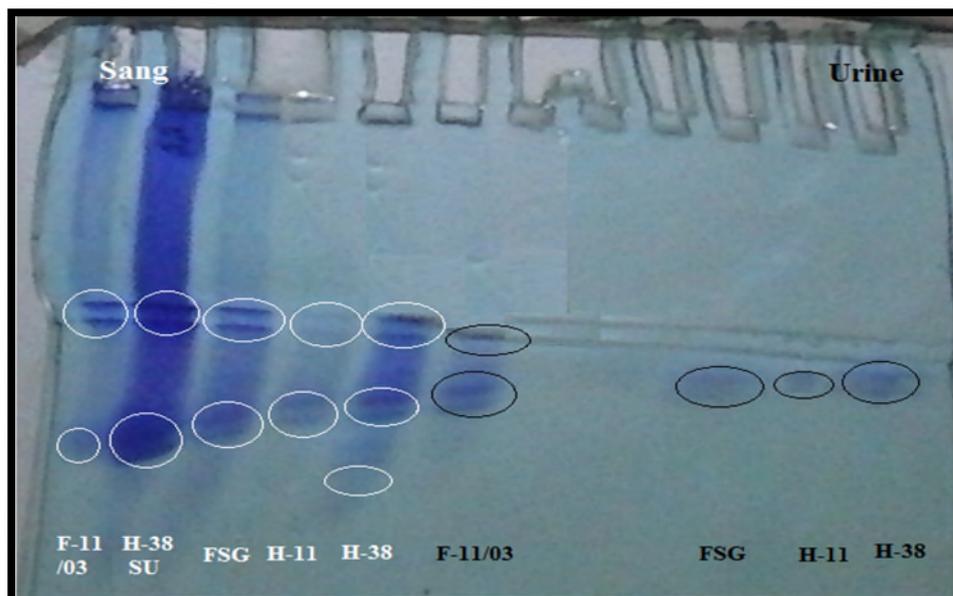


Figure 23 : le profil électrophorétique des différents échantillons du sang et des urines

Les protéines plasmatiques et urinaires des patients atteints des tumeurs cérébrales sont migrées sur le gel polyacrylamide en présence de SDS. Au cours de cette migration, des variations dans le profil protéiques sont notés pour chaque patient dont on observe :

• Dans les pistes sanguines :

- ✓ **Piste F-11/03** : représente 3 bandes dont, 2 bandes qui se sui migrent vers le milieu et 1 bande migre un peu loin vers le bas.
- ✓ **Piste H-38SU** : possède 4 banes dont, 2 migrent moins que les 2 autres qui ont migré plus que la 3eme bande de l'échantillon **F-11/03**.
- ✓ **Piste FSG** : montre la présence de 4 bandes, d'où 2 bandes en haut migrent dans le même niveau que les 2 premières bandes des échantillons précédant, tandis que les 2 autres déplacent un peu loin mais inférieur aux 2 dernières bandes de la piste **H-38SU**.
- ✓ **Piste H-11** : présente 4 bandes dont 2 bandes en haut migrent toujours à la même ligne que les échantillons de sang cités au part avant, et les 2 autres bandes migrent moins que celle de la piste **FSG**.
- ✓ **Piste H-38** : 5 bandes sont visibles, des quelles 2 sont au haut (même niveau que les pistes d'avant) et les 2 autre migrent moins que celles de piste **FSG**, tandis que la cinquième bande migre plus loin comparant avec toutes les pistes.

La comparaison de pistes sanguines nous permet démontré que : l'échantillon **H-38** qui présente le nombre de bande le plus élevé (5) est l'échantillon le plus riche en protéines sanguines. ; Puis les échantillons **H-11**, **FSG** et **H-38SU** qui représente 4 bandes ont un taux moins élevé en protéines plasmatiques et ensuite l'échantillon **F-11/03** qui possède 3 bandes a le taux le plus faible en protéines sanguines comparant aux échantillons précédant.

• Dans les pistes urinaires :

- ✓ **Piste F-11/03** : montre la présence de 3 bandes ; dont 1 bande migre moins que les 2 autre bandes.
- ✓ **Piste FSG** : présente 2 bande qui migrent l'une près de l'autre mais inférieur au bandes de l'échantillon urinaire F-11/03.
- ✓ **Piste H-11** : possède 1 seul bande qui migre à une distance moindre que les bandes de l'échantillon précédant.
- ✓ **Piste H-38** : représente 2 bandes migre l'une suivant l'autre, et cette migration et inferieur par rapport a tous les échantillons urinaires.

Partie pratique et discussion

L'évaluation des quatre pistes urinaires prouve que : l'échantillon **F-11/03** qui présente le nombre de bandes le plus élevé (3) est le plus riche en protéines urinaires ; suivant par les échantillons **FSG** et **H-38** qui représentent 2 bandes, ont un taux moins élevé, et en fin l'échantillon **H-11** qui montre la présence d'une seule bande et ceci se traduit par le taux le plus faible en protéines urinaires.

En comparant les pistes protéiques et les pistes urinaires on remarque que 2 les bandes retrouvées dans le même niveau chez les échantillons plasmatiques sont majoritairement absentes chez les échantillons urinaires à l'exception de l'échantillon **F-11/03** qui représente une seule bande à ce niveau. Ainsi, que le nombre de bandes sanguines est plus élevé que celui des urines, ce signifie que nous avons plus de protéines sanguines que de protéines urinaires.

La migration de protéines sanguines est prolongée assez loin comparant à celles des urines qui ne migrent que pour une distance étroite et moindre. Ceci traduit par la différence de la masse moléculaire d'où le poids moléculaire de protéines urinaires est quasiment supérieur aux poids moléculaires de protéines sanguines chez nos patients.

Étant donné que la perméabilité dans le processus de filtration glomérulaire est sélective aux passages des molécules inférieures à **60kDa** cela nous permet de supposer d'après les résultats obtenus que probablement à cause d'un dysfonctionnement dans la filtration glomérulaire on retrouve dans les gels d'électrophorèse des échantillons des urines des bandes pouvant correspondre à des protéines de haut poids moléculaire.

IV- La spectroscopie IR-TF :

- A partir des solutions mères d'urines et du sang, nous avons préparé des concentrations de $5\mu\text{g/ml}$.
- L'introduction des échantillons est effectuée à l'aide d'une seringue.
- Nous avons déposé une à deux gouttes de chaque échantillon dans une fenêtre de la cellule à circulation (**figure24**) puis la fermé par une deuxième fenêtre à l'aide des vis.



Figure 24: la cellule à circulation

- Les plaques de la cellule à circulation est rincé avec de l'eau distillé et nettoyer par un papier absorbant pour chaque échantillon
- Toute fois un échantillon est donc soumis aux rayons IR

Les résultats de la spectroscopie IF-TR obtenus sont représentés dans les figures suivantes :

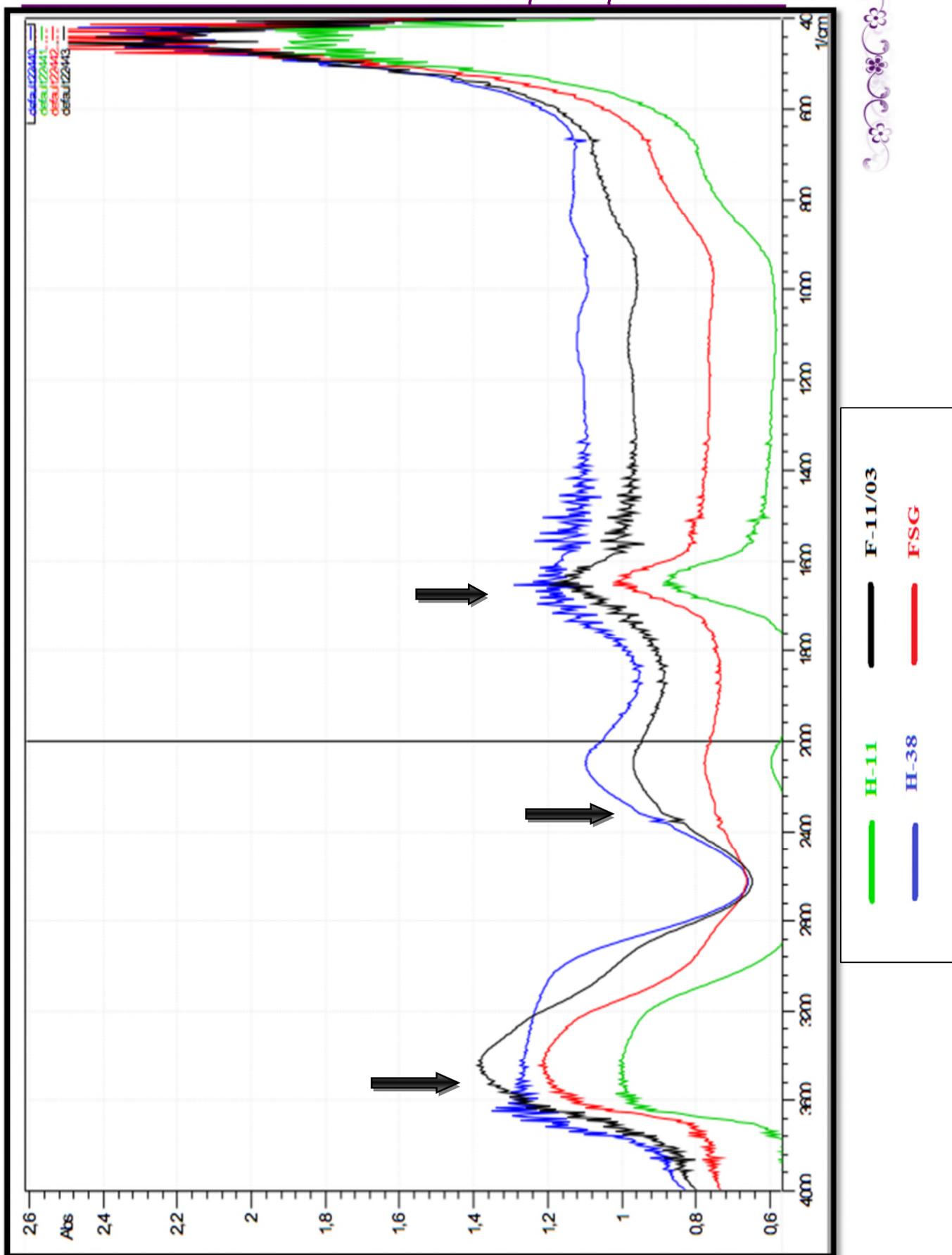


Figure 25 : le profil de tous les échantillons des urines

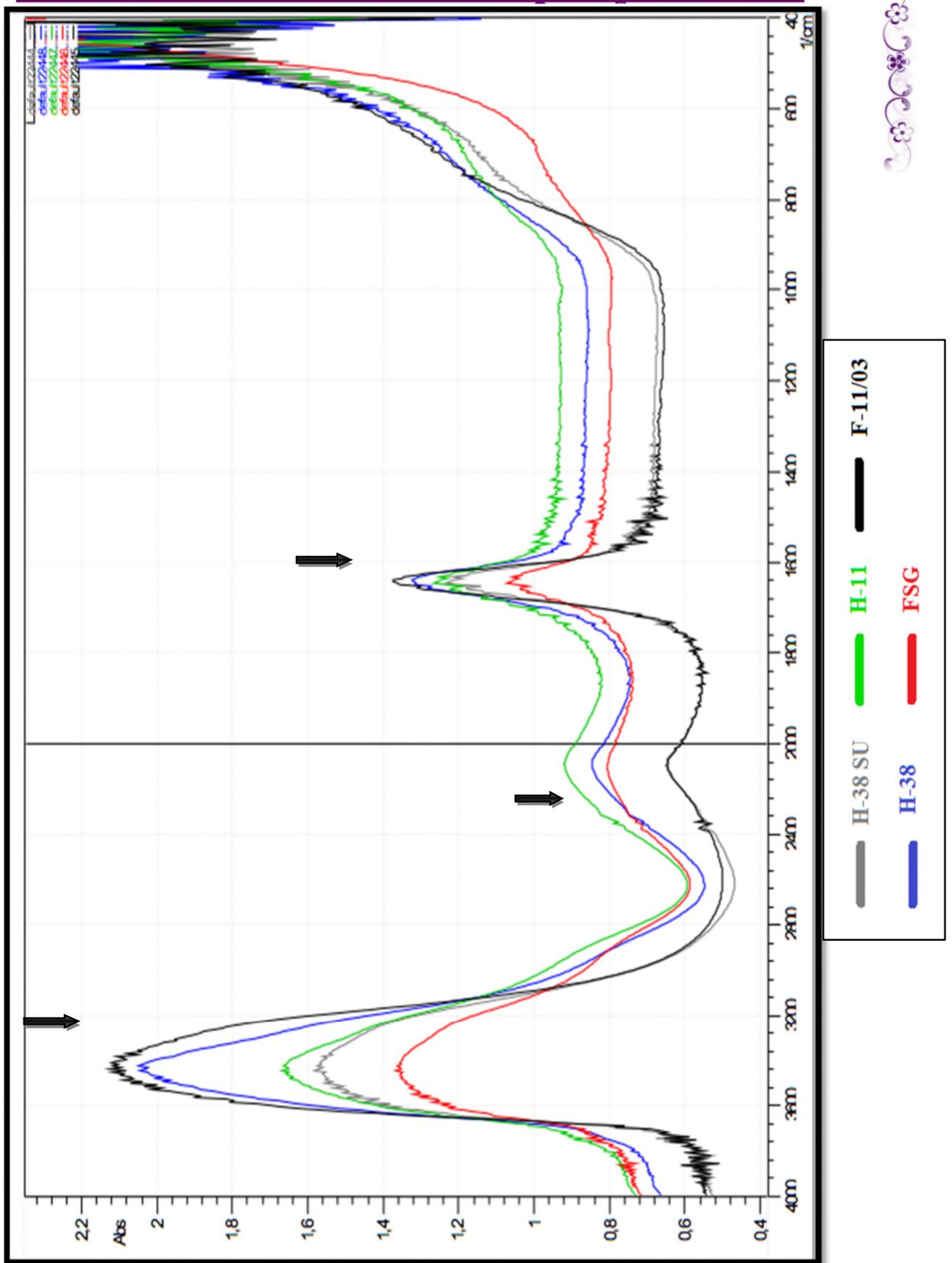


Figure 26 : les profils de tous les échantillons du sang

Les résultats de spectroscopie infrarouge infra rouge de nos patients montrent que :

- Dans les domaines d'absorbance allant de 4000 à 3000 cm^{-1} nous observons que les profils urinaires et sanguins des patients (F-11/03) et (H-38) présentent une intensité d'absorbance la plus élevée, suivi par les patients (H-11), (H-38SU) et (FSG) respectivement ; ils possèdent dans ces domaines les familles chimiques correspondant aux composés acétyléniques, aux groupements OH libres et polymériques et ainsi les acides libres et liés.

- Dans les domaines d'absorbance allant de 2400 à 2000 cm^{-1} nous remarquons dans les deux profils urinaires et sanguins l'existence d'un pic chez certaines patients et son absence chez d'autres ; le tableau ci-dessous résume la présence et l'absence du pic (2400 à 2000 cm^{-1}) qui nous permet de classer nos échantillons en groupes :

Tableau 16 : présence ou absence du pic (2400 à 2000 cm^{-1}) dans les profils du sang et d'urine de chaque patient

Echantillons	Urine	Sang
H-38	+	-
H-11	+	-
FSG	-	-
F-11/03	+	+
H-38SU	/	+

- ❖ **Groupe 1 :** le pic (2400 à 2000 cm^{-1}) est présent dans les profils urinaires du patient **H-38** et **H-11** et absent dans les profils sanguins de ces derniers.
- ❖ **Groupe 2 :** correspond à la patiente **FSG**, d'où le pic (2400 à 2000 cm^{-1}) est absent dans ces deux profils urinaire et sanguin.
- ❖ **Groupe 3 :** la femme **F-11/03** présente le pic (2400 à 2000 cm^{-1}) dans son profil urinaire et son profil sanguin.

Partie pratique et discussion

- Dans les domaines d'absorbance allant de 1800 à 1400 cm^{-1} nous remarquons que les profils de tous les échantillons du sang ont le même ordre d'intensité que dans les domaines (4000 à 3000 cm^{-1}) qu'ils les précèdent ; tandis que dans les profils de tous les échantillons d'urines nous observons que le profil du patient **H-38** est absorbé avec une intensité supérieure comparant aux domaines (4000 à 3000 cm^{-1}) et ceci à partir du domaine 3200 cm^{-1} . Les domaines d'absorbance (1800 à 1400 cm^{-1}) présentent des composés aromatiques et un changement de conformation au niveau du groupement NH chez tous nos patients.

- Dans les domaines d'absorbance de 800 à 600 cm^{-1} nous remarquons l'existence d'un pic dans les profils urinaires des patients (**H-38**), (**H-11**) et (**F-11/03**), et son absence chez la patiente **FSG** ; par contre les profils sanguins de nos échantillons ne détectent pas ce pic.

- D'une vue générale nous observons que l'intensité d'absorbance dans les profils de tous les échantillons du sang est beaucoup plus élevée comparant à celle des urines, et ceci indique que le taux des protéines plasmatiques est beaucoup plus élevé que celle des protéines urinaires.



Conclusions et



perspectives

Conclusions et perspectives

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a enregistré 7,6 millions de décès par le cancer à travers la planète en 2008, cela correspond à environ 13% de la mortalité mondiale, ils représentent la deuxième cause de décès par après la maladie cardiovasculaire (**Société Canadienne du Cancer, 2011**). En Europe la tumeur cérébrale représente la 12ème place en termes de nouveaux cas dont 50% sont des gliomes, 30% des méningiomes et les 20% d'autres tumeurs cérébrales (**Halboub et al, 2012**) (**Idbaih, 2010**).

Le sang et les urines sont les liquides biologiques les plus importants et les plus abondants présents dans l'organisme où les marqueurs tumoraux sont retrouvés soit dans le sang soit dans les urines ou bien dans les deux fluides biologiques (**Puyraimond, 2007**).

Dans le cadre de nos études, le sang et les urines étaient collectées à l'admission des patients atteints les tumeurs cérébrales au niveau de l'hôpital, les cinq échantillons pris sont de différents âges et sexes dont trois malades sont des hommes et les deux restants sont des femmes, avec une prédominance de l'âge 11ans et 38 ans.

L'analyse effectuée de nos échantillons par la méthode colorimétrique de Bradford nous permet de remarquer une diminution de concentration protéique sanguins et une augmentation protéique urinaires. Toutefois, cette variation est observée aux différents classes, qui ne sont liée ni à l'âge n'est au sexe des malades mais peut être due aux différents stades de l'évolution tumorale ou/ et aux type de celle-ci.

Une concentration élevée des protéines dans les urines (protéinurie) peut être décelée dans la plupart des maladies rénale et selon (**Tietz ; 1999**) et (**Young ; 1997**) mentionnent que la protéinurie s'apparaitre notamment dans les insuffisances rénales et les tumeurs rénales malignes. Comme, le taux élevé de la CPU peut être liée à d'autres maladies précisément la fièvre, les saignements ainsi que le stress.

Le dysfonctionnement glomérulaire peu être due à l'augmentation de la perméabilité glomérulaire, à une réabsorption tubulaire élevée ou à une sécrétion anormales des protéines dans les urines (**Tietz ; 1999**) (**Young ; 1997**).

L'analyse électrophorétique nous renseigne sur l'aspect quantitatif où les protéines sanguines sont proportionnellement supérieures au taux de protéines urinaires, et aussi nous informe sur le poids moléculaire de ces protéines dont on trouve

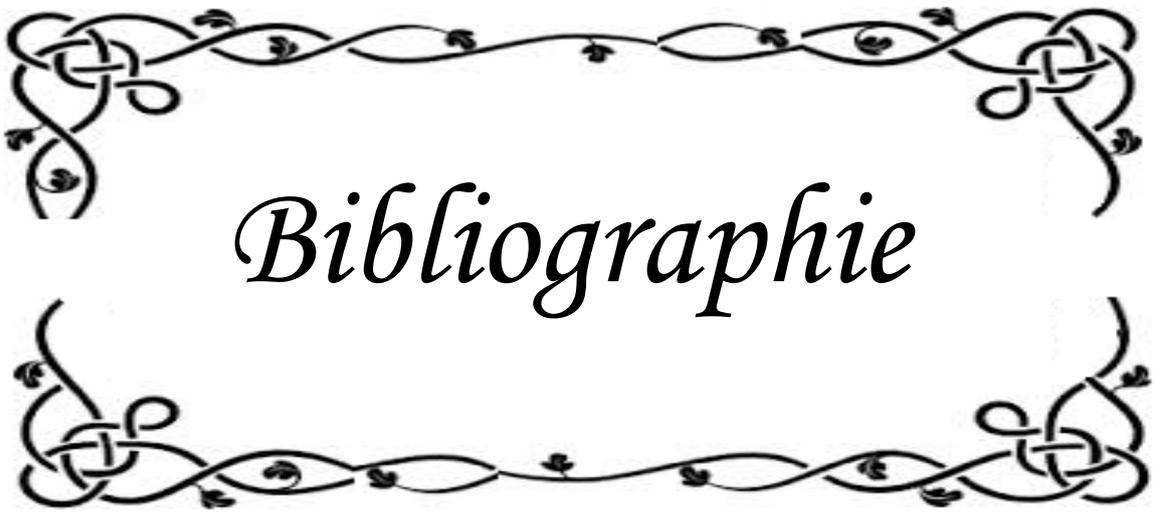
Conclusions et perspectives

que les protéines sanguines de nos patients ont un poids moléculaires inférieurs comparant à celle des protéines urinaires.

L'électrophorèse des protéines sériques et urinaires est un examen simple, réalisé en routine qui permet de dépister et participe au suivi de nombreuses pathologies.

L'analyse de spectroscopie infrarouge permet de nous donner des aidés sur l'aspect qualitatif des molécules. Toute fois nous avons observé les familles chimiques constituantes pour chaque profil urinaire et plasmatique des patients ; ainsi que, la différence de l'intensité d'absorbance visualisé dans les graphes de chaque malade nous récapitule l'aspect quantitatif des molécules d'où les intensités les plus élevés nous renseignent sur le taux protéique le plus élevé, c'est exactement le cas des protéines plasmatiques remarqué dans les profils plasmatique, dont elles sont beaucoup plus élevés comparant par celle des urines. Dans le cas où le pic correspond à une chaîne polypeptidique primaire, cette dernière peut être le résultat de la sécrétion d'une protéine mal repliée ou bien issue du clivage de la totalité ou d'un fragment de la partie extracellulaire d'une protéine exprimée à la surface des cellules tumorales (**DeRycke et Ghidouche, 2010**) (**Hoffmann, 2013**)

Malgré l'apport de nos résultat, nous proposant de mettre en évidence l'utilisation du liquide céphalorachidien pour mieux développer les connaissances concernant les marqueurs tumoraux et évaluer leurs existences au niveau de ce fluide.



Bibliographie

Références bibliographiques

A

Aubron, C., Huet, O., Ricome, S., Borderie, D., Pussard, E., Leblanc, P.E., Bouvet, O., Vicaut, E., & Denamur, E. 2012. Changes in urine composition after trauma facilitate bacterial growth. *BMC infect. Dis.* 12:330.

B

Bailey, S.L., Carpentier, P.A., Mahon, E.J., Beqolka, W.S., & Miller, S.D. 2006. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit. Rev immunol.* 26: 149-188.

Balcells, A. 1998. Examen de laboratoire pour le praticien. Ed Masson. Paris. 612p.

Bauman, G., & Macdonald, D. 2007. CNS. Central Brain Tumor Registry. <http://www.cbtrus.org>

Bellabeh, P., Braun, A., Nedergaard, M. 2004. The blood brain barrier: an overview: structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 16: 1-13.

Benabdesselam, O., Ziani, S., beaudaux, J.L. 2007. La protéine S-100B : biomarqueurs de diagnostic et de suivi de lésions cérébrales aiguës. *Spectra.* 158 : 40-45.

Benzekry, S., 2011. Modélisation et analyse mathématique de thérapies anti-cancéreuses pour les cancers métastatiques. Thèse. Doc. Univ. Marseille.

Bladid, N. 2012. Stress oxydatif et profil nutritionnel chez une population de femmes atteintes de cancer du sein dans la région de Tlemcen. Thèse. Doc. Université Aboubekr Belkaid. Tlemcen. 9p.

Bouyssières, C. 2009. Induction de signaux calciques dans les cellules gliales de la substance noire réticulée par la stimulation électrique du noyau sous thalamique. Thèse.doc. université Joseph Fourier. Grenoble. 39p.

Boyle, P & Levin, B. 2008. World cancer report 2008. IARC.

Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. biochem.* 72, 248-254.

Bradford, M. 1976. *Anal. Biochem.* 72, 248 – 256.

Bricon, T. 2002. Identification et dosage des protéines urinaires au laboratoire d'analyse. *Ann Biol Clin.* 60 : 525-540

C

Camus, G. 2009. L'électrophorèse.

Chatti, K. 2010. L'électrophorèse : Bases physiques et applications médicales. 16p.

Chpin, D., Cappelen, D., Fradvanyi, F., & Gattegno, B. 2001. Bases fondamentales de la carcinogenèse urothéliale. 5 : 877-923.

D

De Rycke, M.S., Pambuccian S.E., Gilks B., Kalloger S.E., Ghidouche A., Lopez M., Bliss R.L., Geller M., Argenta P.A. 2010. Nectin 4 Overexpression in Ovarian Cancer Tissues and Serum. Potential Role as a Serum Biomarker. *Am J Clin Pathol* 2010;134:835-845

Delabesse, E. 2011. *Généralité sur le sang et les organes hématopoïétiques. Laboratoire hématologie CHU Burpan. 3p.*

Delahaye, A. 2008. Génétique et cancer. Cours DCEM1.15p.

Dénis, I., Neyron, M.J., Szymanowicz, A. 2006. Proposition de textes interprétatifs prêt à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines urinaires. *Spectra Biol.* 155 : 41- 51.

Dubois, M. 2008. Développement de techniques analytiques pour l'évolution des protéines thérapeutiques et des biomarqueurs par spectrométrie de masse. Thèse.doc. université pierre et marie curie. Paris 6. 16p.

E

Emily, M. 2006. Modèles statistiques du développement de tumeurs cancéreuses. Thèse. Doc. Inst. Nat. Plytec. Grenoble. France. 220p.

Essendoubi, M., 2007. Identification et typage par (micro)spectroscopie IRTF des levures du genre *Candida* d'origine clinique. *Thèse Doc. Univ. Reims Champagne-Ardenne. France: 218p.*

F

Fortier, P. 2005. Mise au point d'un système de thérapie génique utilisant le gène HSV-TK couplé au promoteur muté de l'alpha-foetoprotéine dans un vecteur adénoviral. Thèse. Université de Laval .Luc .11p

G

Gillet, S. 2007. La chromatographie et l'électrophorèse. 200-202p.

Goran, H.M. 2009. Serum total protein. Clin. Biochem. www.pdffactory.com.

Gornall, Bardawill, C.J., & David, M.M 1949 J. Biol. Chem. 177, 751.

Gruckers, S. 1978. Toxicité rénale des aînés, de l'éthylène glycol et des végétaux chez les carnivores domestiques. Thèse. Doc. Université de Claude- Bernard. Lyon. 5p.

Références bibliographiques

Gwenaille, I., 2008. Mutagenèse et cancérogenèse. Revu électronique internationale. 4p

H

Hablutzel, J. 2009. Les tumeurs cérébrales et du système nerveux central. Ed. Ligue suisse contre le cancer. Berne. 10p.

Halboub, E.S., Abdulhuq, M., & Al-Mandili, A. 2012. Oral and pharyngeal cancers in Yemen: a retrospective study. *EMHJ* .Vol. 18 No. 9.995-991.

Hanahan, D., & Weinberg, R. 2000. The Hallmarks of Cancer. Review. Cell. 100: 57-70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 144: 646-674.

Hanahan, D., & Weinberg, R. 2012. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. Cancer Cell. 21 : 309-322

Heron, J-F. 2003. Les marqueurs tumoraux. Doc. Faculté de médecine de Caen. France. 1-3p.

Hoffmann, F. 2013. HER2-positive breast cancer an aggressive type of breast cancer. *Roche Group Media Relations. Roche Group Media Relations. Switzerland. 2p.*www.roche.com

I

Idbaih, A. 2010. *Contribution de la biologie des tumeurs cérébrales à la prise en charge des patients.* 2p.

Institut de Santé Publique d'Epidémiologie et de Développement (ISPED). 2006. Généralité sur la barrière hémato-encéphalique. 1p.

Institut National du Cancer (INC). 2010. Les traitements du cerveau. France. 11p

J

Joseph, N. 2000. Contribution à la mise au point d'une technique simplifiée de mesure de la clairance de la créatinine endogène pour l'évolution de la fonction glomérulaire chez le chien. Thèse. Doc. Ecole national vétérinaire. Lyon. 7p.

Références bibliographiques

Judware, R., Clup, L.A. 1997. Extracellular matrix receptors: alteration during tumor progression. In encyclopedia of cancer. Anonymous eds. 660-679.

K

Kerbel, R.S., Robert, S. 2008. Tumeur angiogenesis. The new england journal of medecin. 358: 2039-2049.

Klein, J., 2009. Le recepteur B1 des kinines dans la fibrose rénale : des mécanismes au potentiel thérapeutique. Thèse. Doc. Université De Toulouse. 2-5 p.

Knudson, A & G.J. 1971. Mutation and cancer: statistical study of rétinoblastoma. Proc Natl Acad Sci.USA. 68 (4): 820-823.

Knudson, A & G.F. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natel Acad Sci USA 68 (4) : 820-823.

L

Laemmli, U.K. (1970) .Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" Nature .227, 680 – 685.

Laurent, C. 2011. Caractérisation de marqueurs moléculaires associés à un haut risque de développement de métastases chez des patients atteints de mélanome de la choroïde. Thèse.Doc. Université de paris-sud XI. 19-25.

Lavner, M., Imbert, M., Jouault. 2000. Première réunion du club des laboratoires : le GBEA 2 au cœur de débat. Revue française des laboratoires. 324 : 12-13.

Legrand, A., Del corso, A., & Garnotel, R. 2008. Le guide des examens biologiques. Le quotidien de pharmacien. 150.16p.

Lo, E., Sigal, A., et al ; 2001. Drug delivery to damaged brain. Brain Res Rev. 38:140-148.

Lott, J-A., Stephan, V.S., & Pritchard, K.A., 1983. Evaluation of coomassie Brilliant blue G 250 method for urinaryprotein. *Clin-Chem.* 29(11): 1946-1950.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Frry, A., & Randall, R.J. 1951. J. Biol. Chem. 193, 251.

M

Manca, C. 1999. Reactivite du nitromethane induite par irradiations selectives: determination des formes ACI et ACI-ION. *Thèse Doc. Univ. Aix-Marseille I. France.* 42p.

Marieb, E.N. 2008. Principes anatomie et physiologie humain. Ed. de renouveau pédagogique Inc. De Boeck université. Bruxelles. Paris. 222-382.

Massé, C. 2011. Physiologie rénal. Laboratoire de physiologie. Faculté de médecine. Montpellier. 2p.

Références bibliographiques

Mejean, A & Lebret, T. 2008. Genèse de la métastase la cascade métastatique : angiogenèse et nouveaux concepts. *Progrès en Urologie Suppl. 7 : S156-S166.*

Menche, N. 2006. Anatomie Physiologie Biologie. Ed. Maloine. Paris. 181-193.

Mohamed, F. 2010. Etude multicentrique de nouveaux marqueurs tumoraux moléculaire dans les épanchements péritonéaux et le sang : analyse par PCR quantitative en temps. Thèse. Doc. Université Jean Monnet de saint Etienne. France. 44-135p.

N

Nadrigny, F. 2006. Identification et exocytose d'organelles dans les astrocytes en culture : couplage de la microscopie à onde évanescente et de la décomposition spectrale. Thèse. Doc. Université Paris 6. 23p.

Novakovic, S. 2004. Tumor markers in clinical oncology. Institute of oncology. Slovenie. 75p.

O

Oussalem, F & Hammamouche, S .2008. Analyse médicale de trois milieux biologiques : sang, urines et selles au niveau de la clinique d'accouchement- Béjaia. DES. Université Abderrahmane Mira. Bejaia. 15p.

Owusu-Apenten, R.K .2002. Food protein analysis. Quantitative effects on processing. Marcel Dekker, Inc. New York. 482p.

P

Pandey, N & Budhathoki, U. 2007. Protein determination through bradford's method of Nepalese mushroom. *Scientific World 5(5) : 85-88.*

Pedentour, F. 2006. Processus de cancérisation au niveau cellulaire. Doc. 5p.

Pedentour, F ; 2006. Processus de cancérisation au niveau cellulaire. Doc. 5p.

Petibois, C., Deleris, G., & Cazorla G.2000. Nouvelle perspective pour la survie biologique des sportifs : analyse métabolique par spectrométrie IR-TF. *Science & Sports 15 95-97*

Prystupa, A.2011. A clinical guide to tumour markers categorized under cancer types – A review. Univ of Lublin. Polanol. 3- 25.

Pujol, J.L ., Boher, J.M ., Grenier, J ., Quantine, X ., Saffont, L ., & Daurès, J.P.1998. L'énolase neurone spécifique et la surveillance des cancers bronchiques à petites cellules. *Rev mal Respire. 519-25p.*

Références bibliographiques

Puyraimond, S. 2007. Examen biologiques complémentaire en biologie. *Lab.Hématologie. EFS de Besançon*.38p.

Q

Querci, M & Somma, M. 2005. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Electrophorèse sur gel d'agarose. Commission Européen. 3p.

R

Radiol, O. 2004. Marqueurs de tumeurs en oncologie Clinique. Institut de l'oncologie. Slovénie. 38 (2) : 73-83.

Raponi, E. 2005. L'expression séquentielle des calciprotéines S-100A1 et SB 100B dans les cellules gliales de système nerveux centrale caractérisé différentes stades développementaux en relation avec leurs potentialités de différenciation. Thèse. Doc. Université de Joseph Fourier. Grenoble1.

Ravand, A .2007. Le mécanisme de l'angiogenèse tumorale. Progrès en urologie 17 : 144-147.

Richard, D., Orsal, D. 2001. Organisation et fonctionnement de système nerveux. Dunod. Paris. 17-61

Richard Lu, Q., Park J.K., Noll, E., Chan, J.A., Alberta, J., Yuk, D., Alzamora, M.G.,

Louis, D.N& Stiles, C.D. 2001. Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. PNAS, 98 (19): 10851-10856.

Richard, P .2004. L'intérêt des anticorps anti Olig 1 et anti Olig 2 dans le diagnostic des gliomes supra tensoriels de l'adulte : étude immunohistochimique de 140 cas.

Rigaud, J ., Tiguert, R ., & Fradet Y . 2002. Marqueurs moléculaires des marqueurs du cancer infiltrant de la vessie. Progrès en urologie 12(5) :1057-1083.

Road, V. 2001. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Thermo Nicolet Corporation. Madison. USA. 8p.*

Rodat, A. 2009. Mise au point d'un système CE-LIF intégré et application à l'analyse de biomolécules. Thèse. Doc. Université de Toulouse. 44p.

Rouleau, C. 2009. Histologie du système nerveux central. PCEM2-histologie. Montpellier Nimes. France. 25p.

Rousseau, J. 2007. Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intratumoral de drogues antinéoplasiques. Thèse. Doc. Université de Grenoble 1. 9p.

Ruth, L & Engellarlt, B. 2008. Rapports d'activités : fonction pour l'aide à la recherche sur la sclérose en plaque.

Références bibliographiques

S

Shnider, A .2008. Neurologie de comportement : la dimension neurologique de la neurophysiologie. Elsevier Masson S.A.S. 251p.

Simon, M. 2009. Organisation et composition de système nerveux. Copyright cours pharmacie.

Solomon, E & Davis, P.W.1981. Anatomie et physiologie humain. Ed. copyright. 232-274

Spitz, J.A. 2006. Etude et imagerie de la polymérisation de l'actine. Thèse Doc. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 214p.

T

Thyss, A., 2011. Marqueurs biologiques et sécrétion ectopique des cancers.

Tietz, N.W . 1999. Clinical guide to laboratory tests, 3rd. Ed.Saunders Co.

V

Vallat, J.M & Magy, L. 2005. Neuropathies périphériques : généralités. EMC neurologie 2 : 175-181.

Van Holde Kensal, E ., Johnson, W., Curtis & Ho P. Shing. 2006. The Binding of Coomassie Blue to Albumin. CHEM331L. Principles of Physical Chemistry Biochemistry, 2nd Ed. 10p.

Verimli, R., Colak ,E ., Yigit, N., Sozen, M., & Ozkurt, S.2000. Electrophoretic aspects of blood-serum proteins of apodemus mystacinus and apodemus agrarius (Mammalia: Rodentia) in turkey. Turk J. Zool. 24: 225-229 p.

Vieillard, J ., 2006. Développement et validation de nouveaux laboratoires sur puce dédiés à la séparation de protéines. Thèse. Doc. Ecole central de Lyon. 6p.

W

Wager, M ., Fontaine D ., & Karayam, T.L .2008. Biologie moléculaire des gliomes de l'adulte : quelques repères pour le neurochirurgien. Neurochirurgie. 54 : 529-544.

Wiebrands, K. 2010. From leaving the Old World to colonizing the New World: A role of epithelial-mesenchymal transitions in carcinogenic progression. *Department of Cancer Biophysics. Hubrecht Institute. Utrecht, the Netherlands. 26p.*

Wiebrands, K. 2010. From leaving the old world to colonizing the new world: a role of epithelial mesenchymal transitions in carcinogenic progression. Department of cancer biophysics. Hubrecht institute. Utrecht, the Netherlands. 26p.

Références bibliographiques

William, J. 2012. Marqueurs Tumoraux Sériques et Syndromes Paranéoplasiques. Diagnostic des cancers. 2p.

Υ

Young & Fiedman. 1997. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th Ed. AACCC Press.

Z

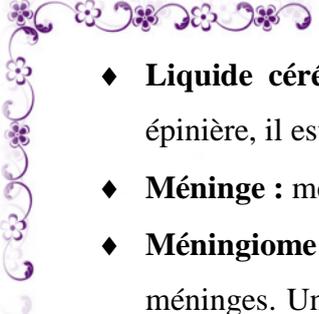
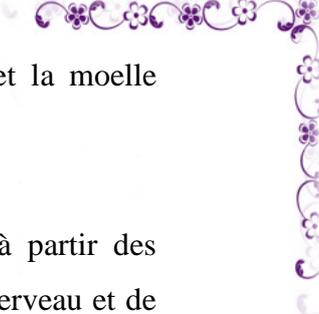
Zenhausern, R. 2011. Utilisation des marqueurs tumoraux en pratique clinique. Institut central (ICHN). Sion.

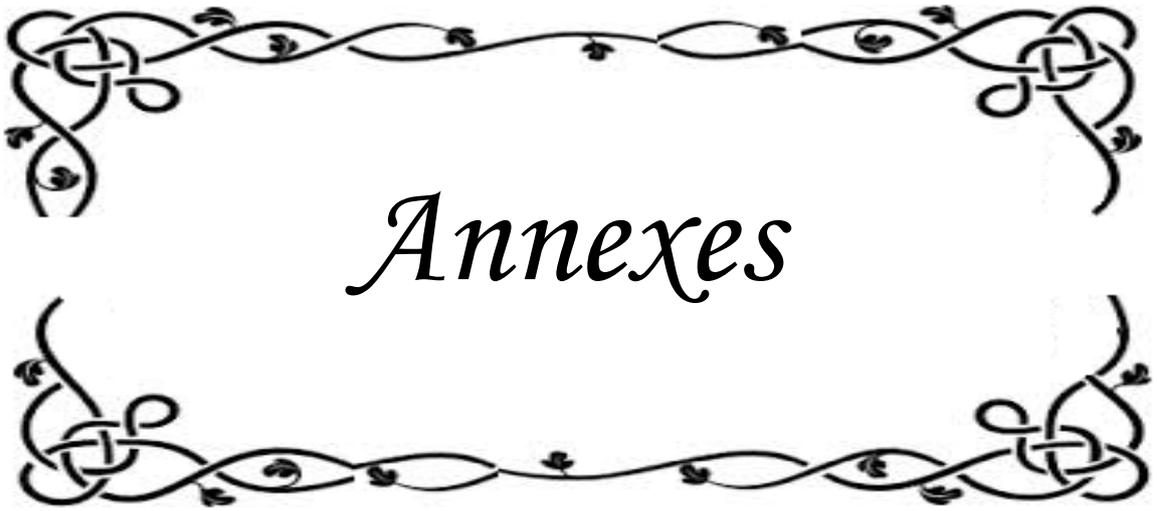
A decorative border consisting of two horizontal lines of stylized, intertwined floral and vine motifs. The top and bottom lines are connected at the corners by vertical flourishes, creating a rectangular frame around the central text.

Glossaire

Glossaire

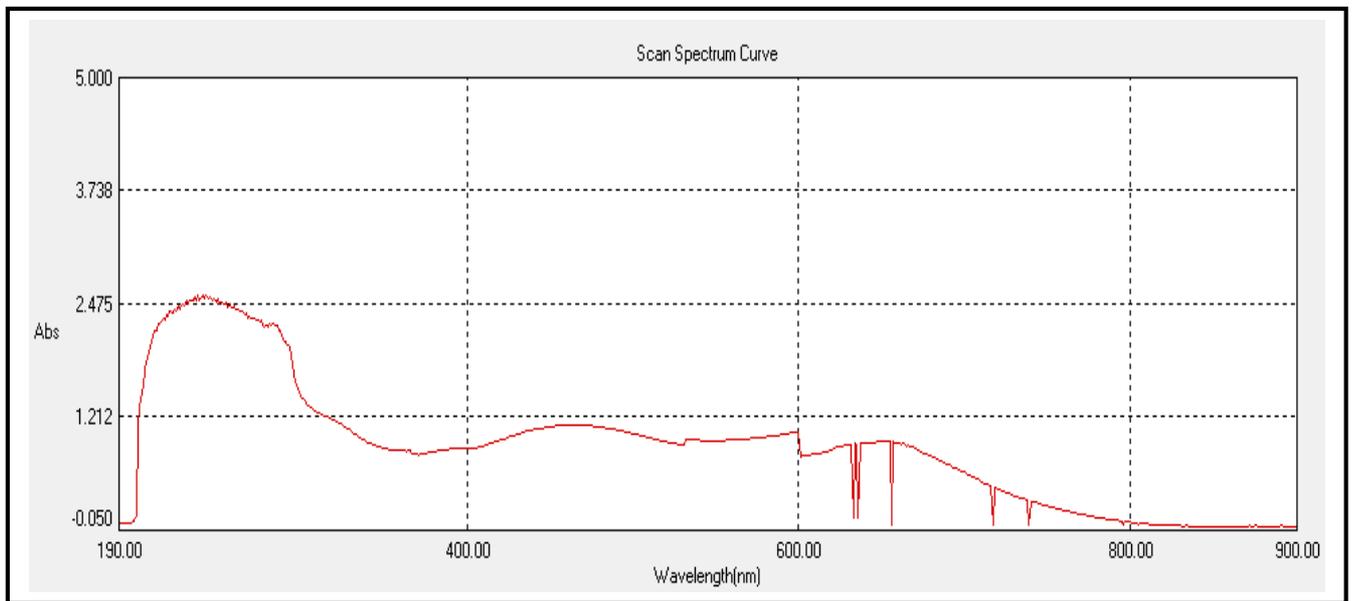
- ◆ **Acide hippurique** : est un dérivé d'acides aminés constitué d'un acide benzoïque et de glycine, il est connu surtout pour les tests urinaires. Sa clairance permet donc de déterminer une insuffisance rénale glomérulaire et /ou tubulaire.
- ◆ **Acide urique** : est un composé chimique résulte de la dégradation et de l'excrétion des purines (guanine et adénine).
- ◆ **Astrocytomes** : tumeur qui se développe à partir des cellules gliales appelés astrocytes. Ils peuvent apparaître dans n'importe quelle zone du cerveau
- ◆ **Biopsie** : c'est le prélèvement chirurgical d'un fragment de tissu ou d'organe pour but d'étudier la nature et la structure du prélèvement grâce à un événement microscopique ou une analyse biochimique.
- ◆ **Bénigne** : non cancéreux. Une tumeur bénigne n'est pas un cancer : elle se développe lentement, sans donner de métastases.
- ◆ **Chimiothérapie** : l'usage de certaines substances chimiques pour traiter une maladie.
- ◆ **Créatinine** : est un produit de dégradation du phosphate de créatine dans le muscle, celle-ci est éliminée par l'urine. Son évolution par les tests urinaires donne une indication sur la capacité de la filtration rénale.
- ◆ **Crise d'épilepsie** : est une affection neurologique caractérisée par des décharges excessive des neurones cérébrales, qui se traduit par des manifestations avec un maximum d'intensité.
- ◆ **Diagnostic** : démarche qui vise à l'identification d'une maladie.
- ◆ **Gène suppresseur** : est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire, son absence d'expression peut entraîner l'apparition d'une tumeur.
- ◆ **Gliome** : catégorie de tumeurs du cerveau qui se développent à partir des cellules gliales*. Il existe plusieurs types de gliomes qui sont : les astrocytome, les glioblastome, oligodendrogliome et épendymome.
- ◆ **Grade** : degré d'agressivité (de malignité*) d'une tumeur. Le grade est déterminé après l'analyse d'un échantillon de tumeur. C'est un élément central du diagnostic. Il permet de prévoir l'évolution possible de la tumeur et de proposer des traitements adaptés.
- ◆ **Holoprotéine** : est un polypeptide constitué uniquement d'acides aminés, par opposition aux hétéroprotéines.

- 
- 
- ◆ **Liquide cérébro-spinal** : liquide dans le quel baignent le cerveau et la moelle épinière, il est appelé aussi le liquide céphalo-rachidien.
 - ◆ **Méninge** : membrane qui entoure le cerveau et la moelle épinière.
 - ◆ **Méningiome** : tumeur le plus souvent bénigne, qui se développe à partir des méninges. Un méningiome peut être localisé n'importe où autour du cerveau et de la moelle épinière.
 - ◆ **Métastase** : tumeur maligne due à la dissémination de cellules cancéreuses provenant d'un premier cancer.
 - ◆ **Nécrose** : est une forme de dégradation cellulaire qui mène à la mort prématuré et non programmé des cellules dans un tissu vivant.
 - ◆ **Oligodendrogliome** : tumeur qui se développe à partir des gliocytes des cellules gliales
 - ◆ **Plexus choroïde** : forme des structures des parois, des ventricules du cerveau ou le liquide cérébro-spinal est secrété.
 - ◆ **Pronostique** : appréciation par le médecin d'une maladie et de son issue en se référant à l'état propre du patient.
 - ◆ **Radiothérapie** : traitement du cancer par des rayons qui détruisent les cellules cancéreuses ou stoppent leur développement.
 - ◆ **Récidive** : réapparition de cellules cancéreuses, au même endroit ou dans une autre région du corps.
 - ◆ **Rénine** : est une enzyme secrété par le rein, située près des glomérules, elle contrôle la pression artérielle.
 - ◆ **Rétinoblastome** : est une tumeur maligne de la rétine d'origine génétique, apparaissant habituellement avant l'âge de 5ans. Empêche la vision et se traduit par un reflet blanchâtre de la pupille
 - ◆ **Sarcome** : est une tumeur maligne qui se forme au dépend de tissu conjonctif ou des tissus qui en dérivent, comme le tissu musculaire, l'os ...
- 
- 

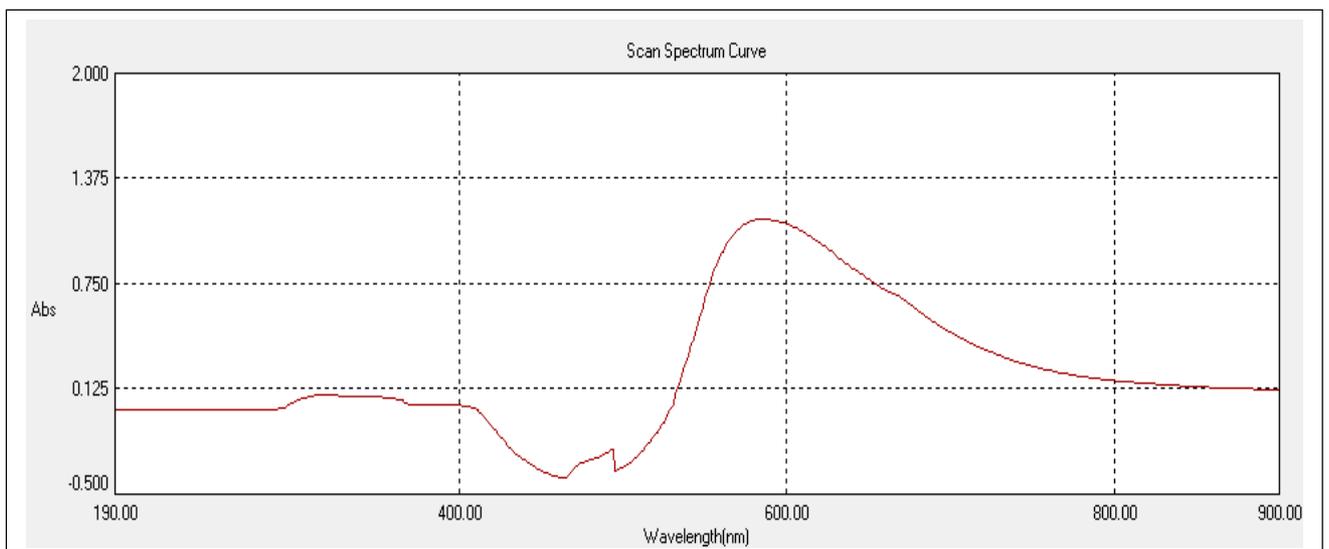


Annexes

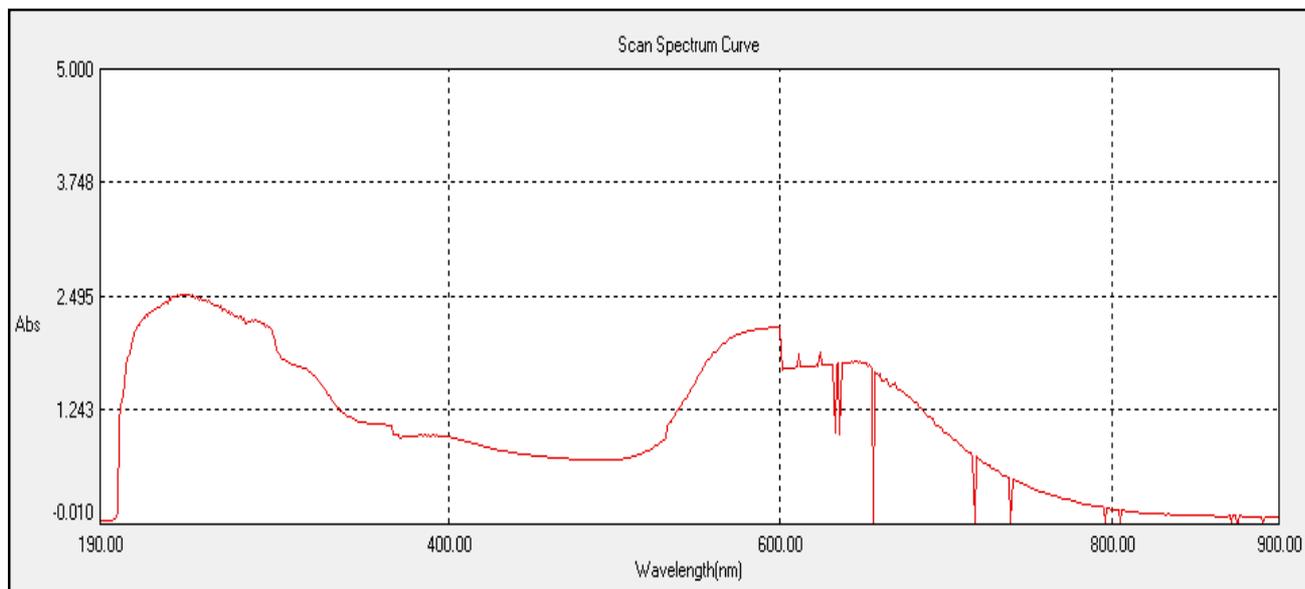
Annexe (1) : le spectre d'absorbance du blanc (réactif de Bradford)



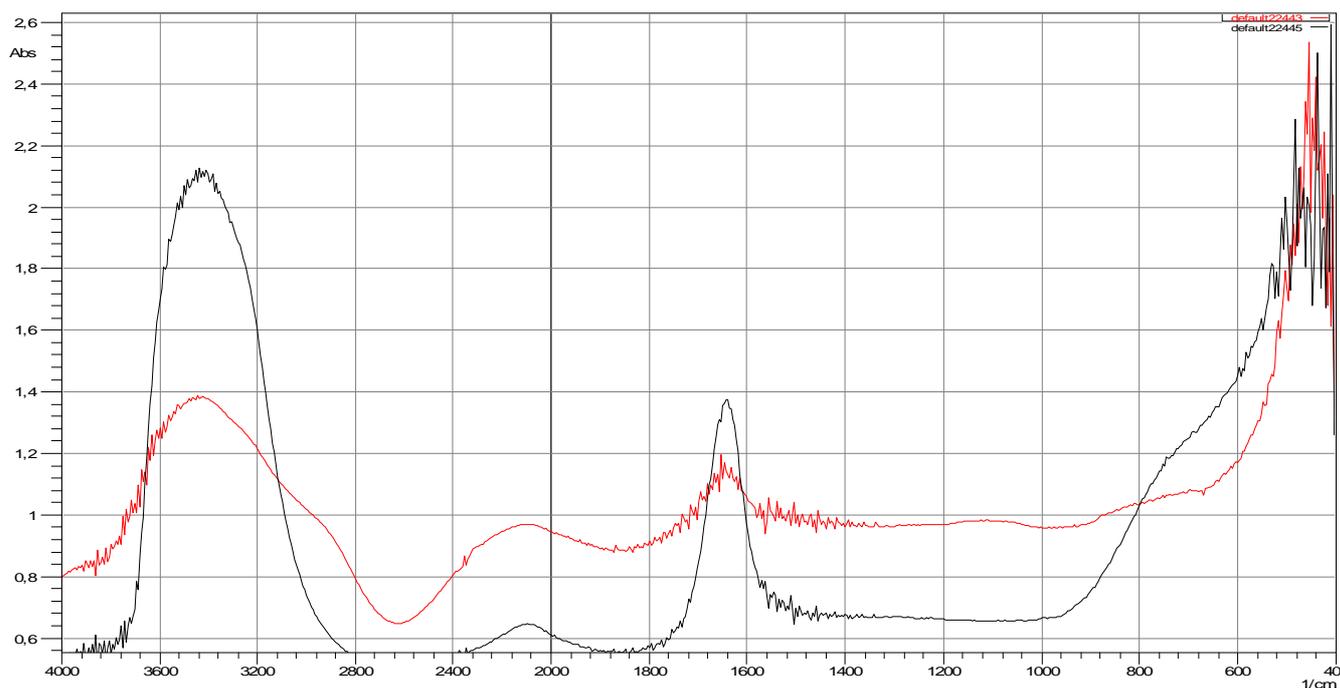
Annexe (2) : le spectre d'absorbance de l'échantillon H-38



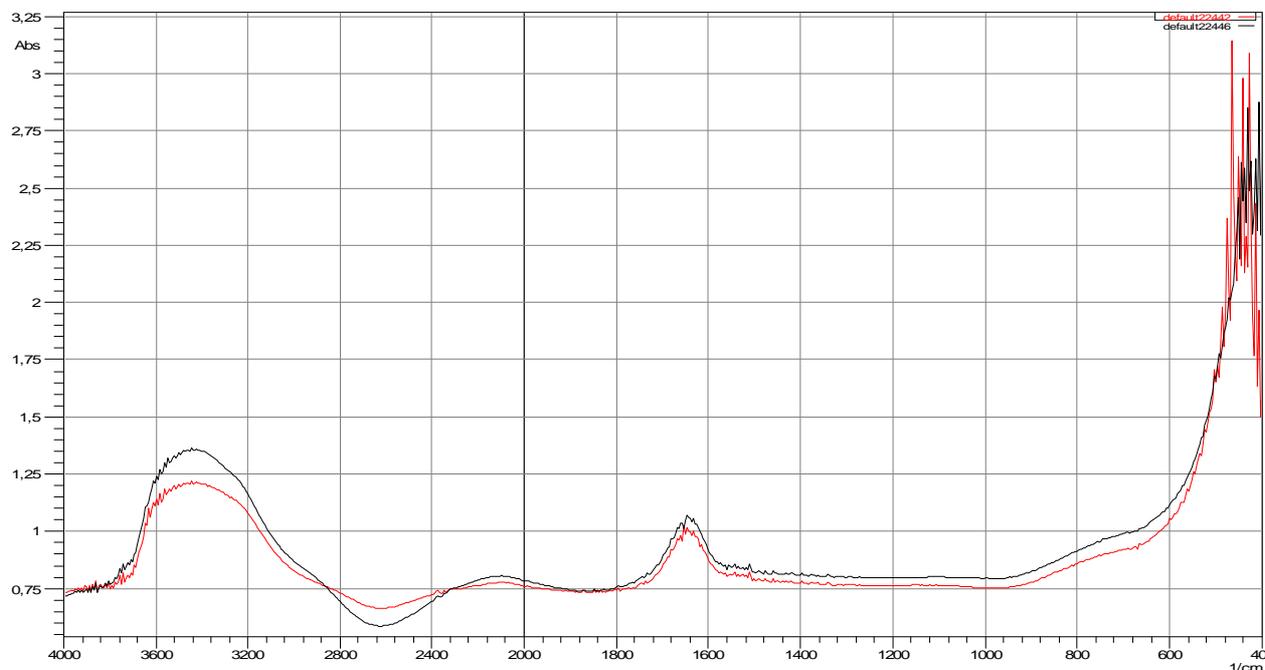
Annexe (3) : le spectre d'absorbance du blanc plus l'échantillon H-38



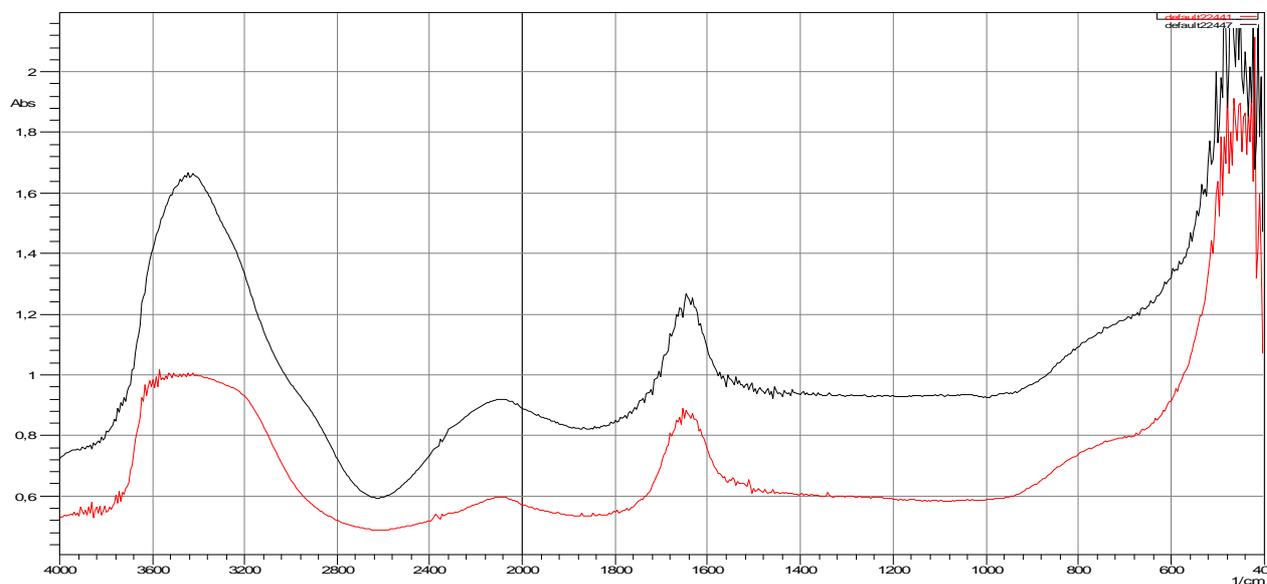
Annexe (4) : le profil sanguin et urinaire de F-11/03



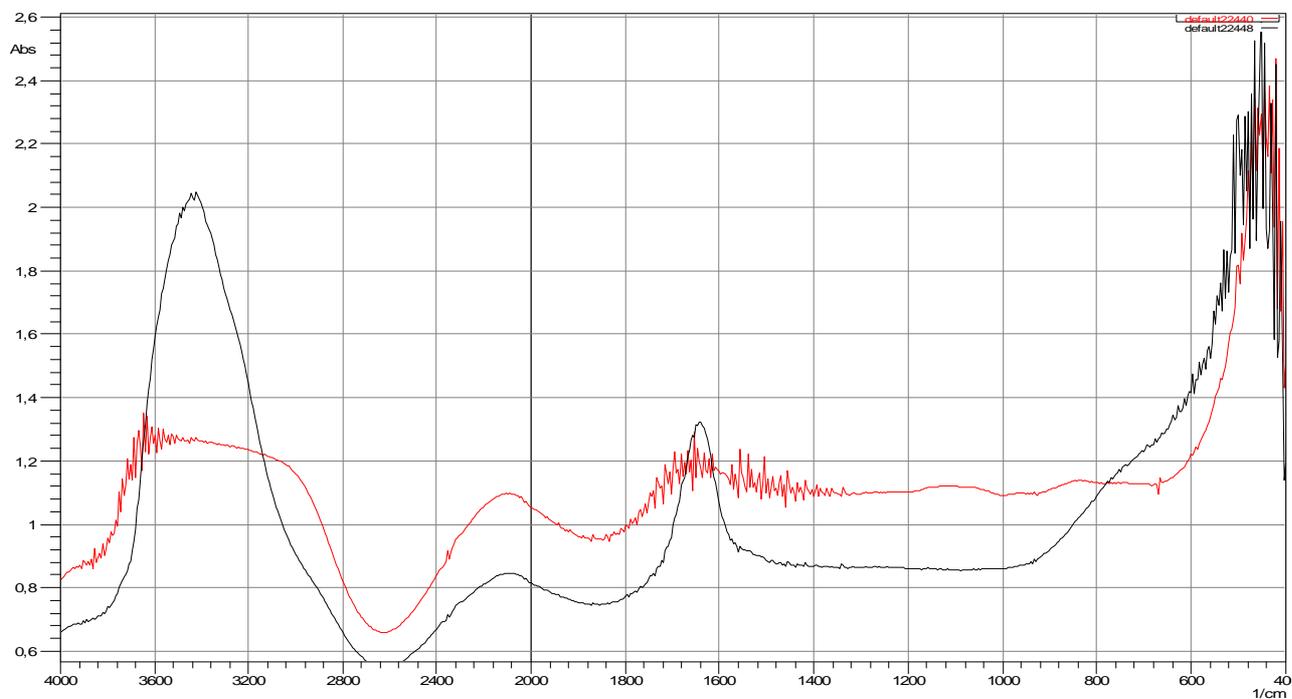
Annexe (5) : le profil sanguin et urinaire de l'échantillon FSG



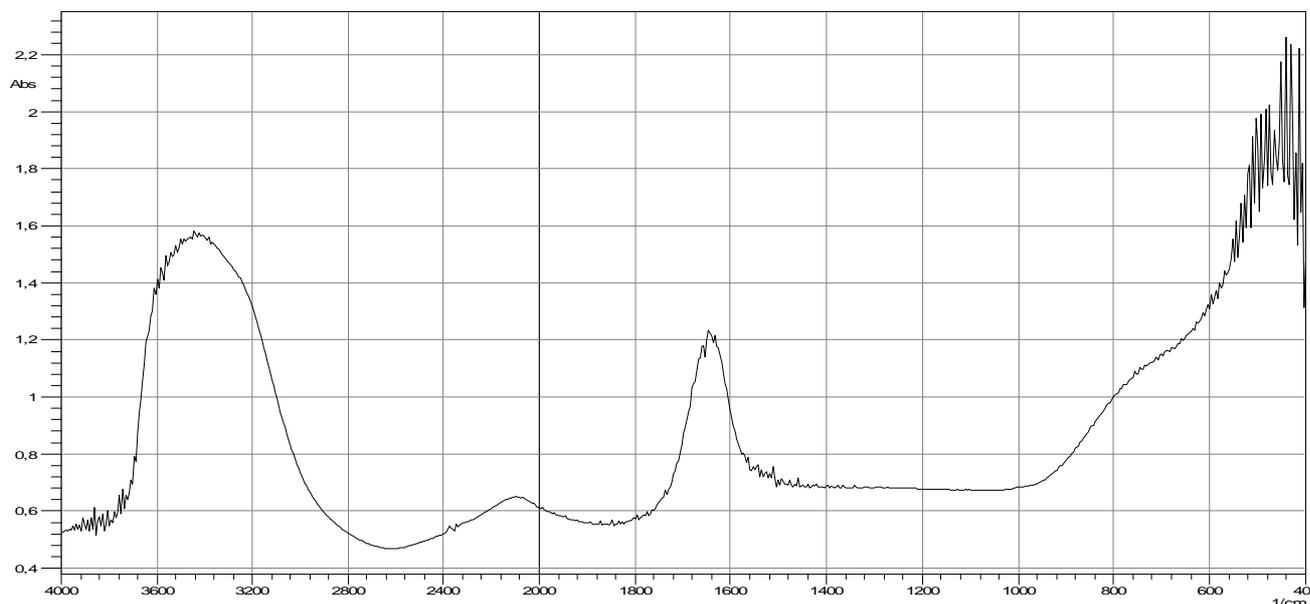
Annexe (6) : le profil sanguin et urinaire de l'échantillon H-11



Annexe (7) : le profil sanguin et urinaire de l'échantillon H-38



Annexe (8) : le profil sanguin de l'échantillon H-38 SU





Résumé :



Selon l'organisation mondiale de la santé, le cancer est l'une des premières causes de mortalité dans le monde, car les pathologies cancéreuses sont à l'origine de 8,1 millions de décès en 2012, soit environ 13% de la mortalité mondiale, un chiffre qui pourrait atteindre 13,1 millions en 2030, ou l'incidence de la tumeur cérébrale représente 8 nouveau cas pour 100 000 habitants et par an. Afin de promouvoir l'intérêt des marqueurs tumoraux dans le suivi des cancers pour évaluer l'efficacité thérapeutique des traitements et les récives précises. Le dosage des protéines dans les liquides biologique (sang et urines) par méthode colorimétrique (Bradford) et non colorimétriques (IR-TF, électrophorèse) des patients atteints des tumeurs cérébrales permet d'obtenir des résultats quantitatif et qualitatifs sur les protéines présentent dans ces fluides. On estimant que les protéines retrouvées dans le sang et les urines sont des marqueurs tumoraux, on suggère que ces derniers peuvent servir à l'identification de nouveaux marqueurs.

Mots clé : Cancer, tumeur cérébrale, marqueurs tumoraux, dosage, liquides biologiques, Bradford, IR-TF, électrophorèse

Abstract:

According to the World Health Organization, cancer is a leading cause of mortality in the world, because cancer diseases are the cause of 8.1 million deaths in 2012, representing around 13% of world mortality, these statistics could reach 13,1 million in 2030, and the incidence of the brain tumors represents 8 new cases for 100 000 people per year. In order to promote the advantage of molecular signatures or tumor markers in the follow-up of cancers to evaluate the therapeutic effectiveness of the treatments. The measuring protein level in blood and urine by colorimetric (Bradford) and n oncolorimetric (IRTF, electrophoresis) method of the patients diagnosed with brain tumors makes it possible to obtain quantitative and qualitative results on proteins present in these fluids. Estimating that the proteins found in blood and the urines are tumoral markers, it is suggested that the latter can be used for the identification of new markers.

Keywords: Cancer, brain tumors, tumor markers, blood, urines, Bradford, IRTF, electrophoresis.

